

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

FERNANDA ZONATTO

**RESÍDUO DE QUINOLONAS EM MÚSCULO, FÍGADO E RINS DE
FRANGO E INFLUÊNCIA DO MATERIAL FECAL NA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *Salmonella* spp.**

DISSERTAÇÃO

**LONDRINA
2020**

FERNANDA ZONATTO

**RESÍDUO DE QUINOLONAS EM MÚSCULO, FÍGADO E RINS DE
FRANGOS E INFLUÊNCIA DO MATERIAL FECAL NA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *Salmonella* spp.**

Dissertação de mestrado, apresentado ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Francisco Beltrão, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto

Coorientador: Prof. Dr. Eder da Costa dos Santos

LONDRINA

2020

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons atribuição uso não comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

Z87r Zonatto, Fernanda

Resíduo de quinolonas em músculo, fígado e rins de frangos e influência do material fecal na resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. / Fernanda Zonatto. - Londrina : [s.n.], 2020.

70 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Elisabete Hiromi Hashimoto.

Coorientador: Prof. Dr. Eder da Costa dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2020.

Bibliografia: f. 53-69.

1. Antibióticos. 2. Ciprofloxacina. 3. Salmonela. 4. Drogas - Resistência em micro-organismos. 5. Cromatografia a líquido. 6. Espectrometria de massa. I. Hashimoto, Elisabete Hiromi, orient. II. Santos, Eder da Costa dos, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

TERMO DE APROVAÇÃO

RESÍDUO DE QUINOLONAS EM MÚSCULO, FÍGADO E RINS DE FRANGO E INFLUÊNCIA DO MATERIAL FECAL NA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Salmonella* spp.

Por

FERNANDA ZONATTO

Esta Dissertação de mestrado foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Francisco Beltrão às 19 h de 27 de agosto de 2020. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

Prof^a. Dr^a. Elisabete Hiromi Hashimoto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Andréa Cátia Leal Badaró
Membro Examinador Titular

Dr^a. Vivian Feddern
Membro Examinador Titular

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a minha família, por todo o incentivo e amor incondicional. Ao Eduardo pelo apoio e paciência nos momentos mais difíceis.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná e a todos os professores que fizeram parte desta trajetória e muito contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento pessoal. Em especial quero agradecer a minha orientadora, Elisabete Hiromi Hashimoto, pela colhida e confiança a mim depositada. Pelo exemplo de profissional, pelos ensinamentos e diretrizes elaboração do trabalho. Ao coorientador Éder da Costa dos Santos pelos ensinamentos e considerações. À professora Alessandra Machado-Lunkes pelo acompanhamento do trabalho e melhorias durante toda a construção.

À Seara Alimentos, pela viabilidade e oportunidade de realização desse trabalho. Em especial, a Taís Regina Michaelsen pelo apoio e todo suporte prestado. A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Saúde Animal pela dedicação e auxílio na execução dos experimentos, pela convivência diária e pelos momentos de incentivo e motivação.

A todos que de alguma maneira participaram e contribuíram para a realização desta pesquisa, muito obrigada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo
mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

ZONATTO, Fernanda. Resíduo de quinolonas na carne e influência do material fecal na resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. em frangos. 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2020.

Na cadeia produtiva de frangos de corte, antimicrobianos são utilizados no tratamento de doenças infecciosas e como promotores de crescimento. O emprego inadequado dos antibióticos pode acumular resíduos na carcaça e transferir cepas resistentes na cadeia alimentar. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de resíduos de antibióticos em músculo, fígado e rins de frangos mediante a criação de 120 frangos de corte (Cobb) em granja experimental. Para isso, os frangos foram medicados durante 5 dias consecutivos, os tratamentos foram aplicados por via oral na água de bebida, sendo: A) água potável (controle) e B) enrofloxacin (10 mg/kg). Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e as amostras de músculo, rins e fígado foram coletadas. A quantificação dos resíduos foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, após a padronização e validação da metodologia. A validação foi realizada através dos parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Além disso, foi avaliada a influência do material fecal na resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp., bem como resíduos de enrofloxacin (ENR) e ciprofloxacina (CIP) de músculo e vísceras de frangos. Para isso, foram coletadas amostras de fezes de frangos em diferentes produtores, e avaliada a resistência da *Salmonella* spp. para os antimicrobianos comerciais, associado aos microrganismos presentes na microbiota gastrointestinal de frangos. Para este estudo, foram utilizadas as técnicas de contato com os antimicrobianos e disco-difusão. Como resultados tem-se uma metodologia para análises de ENR e CIP sensível e viável para aplicação industrial, com LQ de 10 µg/kg, LD de 20 µg/kg, taxas de recuperação de 92,47%-100,91% para ENR e 89,36%-98,33% para CIP para músculo, fígado e rim. Foi definido com os ensaios de depleção para os antimicrobianos comerciais 3 dias para reduzir a concentração de resíduos abaixo do limite máximo de resíduos (LMR) e dessa forma minimizar a problemática associada a resistência. Além disso, houve uma redução da sensibilidade de ENR para a *Salmonella* spp. associada ao material fecal e a resistência a três classes distintas de antimicrobianos testados, indicando a presença de multirresistência. O surgimento e a disseminação de *Salmonella* spp. resistente a antimicrobianos, bem como a presença de resíduos, tem importantes implicações na saúde pública e devem ser constantemente monitorados.

Palavras-chave: Antibiótico. Resistência avícola. LC-MS/MS. Enrofloxacin. Ciprofloxacina.

ABSTRACT

ZONATTO, Fernanda. Quinolone residue in meat and influence of fecal material on the antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in chickens. 2020. 70 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Federal Technology University Paraná, 2020.

In the broiler production chain, antimicrobials are used to treat infectious diseases and as growth promoters. The inappropriate use of antibiotics can accumulate residues in the carcass and transfer resistant strains in the food chain. The objective of this work was to evaluate the presence of antibiotic residues in muscle, liver and kidneys of chickens by creating 120 broilers (Cobb) in experimental farm. For this, the chickens were medicated for 5 consecutive days, the treatments were applied orally in the drinking water, being: A) drinking water (control) and B) enrofloxacin (10 mg/kg). After treatment, the animals were euthanized and samples of muscle, kidneys and liver were collected. The quantification of residues was performed by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer, after standardization and validation of the methodology. The validation was performed through the parameters of linearity, selectivity, precision, accuracy, detection limit and quantification limit. In addition, the influence of fecal material on the antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. was evaluated, as well as residues of enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) of muscle and viscera of poultry. For that, samples of chicken faeces were collected from different producers, and the resistance of *Salmonella* spp. was evaluated for commercial antimicrobials, associated with microorganisms present in the gastrointestinal microbiota of chickens. For this study, the techniques of contact with antimicrobials and disk-diffusion were used. As a result there is a methodology for analysis of sensitive and viable ENR and CIP for industrial application, with LQ of 10 µg/kg, LD of 20 µg/kg, recovery rates of 92.47%-100.91% for ENR and 89.36%-8.33% for CIP for muscle, liver and kidney. It was defined with depletion tests for commercial antimicrobials 3 days to reduce the concentration of waste below the maximum residue limit (MRL) and thus minimize the problem associated with resistance. In addition, there was a reduction in the sensitivity of ENR to *Salmonella* spp. associated with fecal material and resistance to three different classes of tested antimicrobials, indicating the presence of multidrug resistance. The appearance and spread of *Salmonella* spp. resistant to antimicrobials, as well as the presence of residues, has important public health implications and should be constantly monitored.

Keywords: Antibiotic. Poultry resistance. LC-MS/MS. Enrofloxacin. Ciprofloxacin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre administração de diferentes produtos de ENR comercial.....	22
Tabela 2 - LMR para a soma de ENR e CIP em diferentes países.....	24
Tabela 3 - Transições MRM e condições do espectrômetro de massas utilizadas para cada analito.....	31
Tabela 4 - Gradiente das fases móveis.....	34
Tabela 5 - Taxas de recuperação e coeficientes de variação de repetibilidade e reprodutibilidade para ENR e CIP em matrizes de fígado, músculo e rim	39
Tabela 6 - Valores de CC α , CC β , LD, LQ e recuperação no nível de 20 ug/kg para cada analito e tecido estudado.....	44
Tabela 7 - Concentrações de ENR e CIP em amostras de músculo para cada dia de coleta.....	45
Tabela 8 - Concentrações de ENR e CIP em amostras de fígado para cada dia de coleta.....	46
Tabela 9 - Concentrações de ENR e CIP em amostras de rim para cada dia de coleta.....	47
Tabela 10 - Sensibilidade a antimicrobianos para <i>Salmonella</i> isolada e presente no material fecal	48
Tabela 11 - Perfil de sensibilidade a antimicrobianos para <i>Salmonella</i> Heidelberg em amostras de fezes de frangos.	50
Tabela 12 - Antimicrobianos ineficientes no controle de S. Heidelberg e suas respectivas classes.	51

LISTA DE SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ACN	Acetonitrila
APT	Água peptonada tamponada
BHI	Brain Heart Infusion
CC α	Limite de Decisão
CC β	Capacidade de Detecção
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIP	Ciprofloxacina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENR	Enrofloxacina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LD	Limite de Detecção
LLE	Extração Líquido-Líquido
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMQR	Mecanismo de Resistência à Quinolonas Mediada por Plasmídeo
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
SPE	Extração em Fase Sólida
TGI	Trato Gastrointestinal
TSB	Tryptic Soy Broth

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
3.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA AVICULTURA	16
3.2 <i>Salmonella</i> spp. NA AVICULTURA.....	17
3.3 USO DE ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO DE FRANGOS	18
3.4 AMOXICILINA.....	19
3.5 QUINOLONAS	20
3.5.1 Enrofloxacina	21
3.5.2 Ciprofloxacina	22
3.6 RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS	22
3.7 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM CARNE DE FRANGO.....	26
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA PESQUISA DE ANTIMICROBIANOS ..	27
3.8.1 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas.....	29
3.8.2 Parâmetros de validação analítica	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS.....	31
4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO	32
4.3 MÉTODO ANALÍTICO E VALIDAÇÃO	32
4.3.1 Preparo das amostras.....	32
4.3.2 Condições cromatográficas.....	32
4.3.3 Parâmetros de validação.....	34
4.3.3.1 Linearidade.....	34
4.3.3.2 Seletividade.....	35
4.3.3.3 Precisão e exatidão.....	35
4.3.3.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	35
4.3.3.5 Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β).....	36
4.4 DEPLEÇÃO DE ENR E CIP EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE .	36
4.4.1 Criação das aves.....	36

4.4.2	<i>Design</i> experimental	35
4.5	Experimento de resistência à antimicrobianos	37
4.5.1	Coleta das amostras.....	37
4.5.2	Isolamento e tipificação de <i>Salmonella</i> spp.....	37
4.5.3	Teste de sensibilidade a antimicrobianos comerciais.....	38
4.5.4	Teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	39
5.1.1	Linearidade	39
5.1.2	Seletividade	40
5.1.3	Precisão e exatidão	40
5.1.4	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	42
5.1.5	Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β)	43
5.2	DEPLEÇÃO DE ENR E CIP EM TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE .	44
5.3	RESISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS À ANTIMICROBIANOS	47
6	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A produção nacional de carne de frango apresentou um crescimento gradativo no período de 2006 a 2019. O país é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango e líder mundial em exportação do produto (ABPA, 2020). Os elevados índices de produtividade e liderança de mercado requer excelência tecnológica, manejo e a preocupação com a sanidade avícola na cadeia produtiva (COSTA et al., 2015).

Um programa de segurança alimentar deve proporcionar um controle efetivo desde a criação dos animais, produção e distribuição do alimento, frente a diversos patógenos. A enfermidade provocada pelo gênero *Salmonella*, a salmonelose, é uma das responsáveis por surtos de infecção no mundo todo. A dificuldade no controle do gênero se deve às variações genéticas ao longo dos anos e o desenvolvimento da resistência contra diversos agente antimicrobianos, um problema de saúde animal e humana (PARRY; THRELFALL, 2008; WHO, 2009; CHEN, et al. 2013).

Na sanidade avícola, os antimicrobianos são utilizados no tratamento de doenças infecciosas nas aves, para inibir o crescimento ou inativar os patógenos e também como promotores de crescimento (DOYLE, 2006). O emprego inadequado destes medicamentos pode causar o acúmulo de resíduos na carcaça e transferir cepas resistentes na cadeia alimentar. Muitos antimicrobianos utilizados na produção animal são também empregados para tratar doenças em humanos. O que pode resultar em falha terapêutica (ARIAS; CARRILHO, 2012; BONASSA et al., 2017; RAMATLA et al., 2017).

Tendo em vista o sistema de produção atual, eliminar o uso de antibióticos na produção animal pode ser considerada uma estratégia muito simplista. A exclusão destes medicamentos pode repercutir diretamente na saúde animal e humana, além de afetar a produção de alimentos (SINGER et al., 2003; MARTINEZ, 2009). Neste sentido, uma série de medidas de controle do uso de antibióticos faz-se necessário. O perfil de resistência antimicrobiana varia ao longo dos anos e difere de local para local, o que pode resultar em um uso indiscriminado sem efeito terapêutico. Assim, o monitoramento constante do perfil de resistência bacteriana é primordial (ARIAS; CARRILHO, 2012).

O conhecimento da epidemiologia bacteriana é essencial para tomada de decisão no controle de infecção. Diversos mecanismos contribuem para a resistência

de patógenos aos antibióticos. Neste sentido, os estudos sobre comunidade microbiana do trato gastrointestinal (TGI) de frangos tem recebido atenção crescente (BORDA-MOLINA et al., 2018). O TGI é considerado um reservatório para genes de resistência a antimicrobianos, que podem ser transferidos entre a microbiota (QU et al., 2008; TONG et al., 2017). Sendo assim, o patógeno pode apresentar respostas diferentes de sensibilidade ou resistência antimicrobiana se estiver isolado ou associado a microbiota fecal. Tal comportamento, requer mais estudos.

A Enrofloxacina e a Amoxicilina são antimicrobianos de amplo espectro de ação. Um relatório sobre uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte mostrou que estes antimicrobianos estão entre os medicamentos mais empregados no controle com função preventiva na fase de terminação em frangos de corte no Paraná (Paraná, 2005). O estado do Paraná destaca-se como o maior produtor e exportador de frango (SINDIAVIPAR, 2018). Para subsidiar a produção, o emprego desses antibióticos na sanidade avícola precisa ser melhor analisado.

No campo, as medidas a serem adotadas são: o uso de dosagens adequadas e o respeito do tempo de carência do antibiótico. O prazo para eliminação do antibiótico na carne após a última aplicação visa evitar a transferência na cadeia alimentar. Para garantir a segurança aos consumidores, os órgãos reguladores estabelecem os limites máximos de resíduos (LMRs) que podem estar presentes na carne para consumo (LIN, 2014; WHO, 2014).

A problemática da resistência aos antimicrobianos, tem levado os países baixarem cada vez mais o LMR, requerendo metodologias analíticas mais sensíveis (ZHANG et al., 2019). Amostras de tecido animal são consideradas matrizes complexas para análise. Para garantir a dosagem correta dos resíduos em carne de frango, faz-se necessário a padronização de um método sensível e viável ao setor produtivo. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE) é uma técnica analítica utilizada para análises de alimentos, devido a sua alta seletividade e sensibilidade (FERRARI et al., 2015).

O conhecimento gerado através deste trabalho contribui para tomada de decisões no controle de *Salmonella* spp. na cadeia avícola. O estudo abrange a pesquisa do perfil de resistência antimicrobiana; a influência do material fecal; do uso adequado e análise de resíduo de antibióticos na carne de frango.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do material fecal na resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. e pesquisar resíduo de enrofloxacin na carne de frangos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência do material fecal de frango de corte na resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos comerciais Enrofloxacin e Amoxicilina;
- Isolar *Salmonella* spp. resistentes aos antimicrobianos comerciais e avaliar sua sensibilidade a outros antimicrobianos por disco-difusão;
- Validar método analítico de quantificação de Enrofloxacin em matriz de fígado, músculo e rim por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS); e
- Avaliar a depleção de Enrofloxacin em carne de frangos de corte em experimentos a campo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA AVICULTURA

O Brasil é líder mundial em exportação do produto e o terceiro maior produtor mundial de carne de frango (ABPA, 2020). A produção brasileira de carne de frango foi de 13,245 milhões de toneladas no ano de 2019, deste total 32% foram destinados ao mercado externo, principalmente para a Ásia e Oriente Médio. No primeiro quadrimestre de 2020, as exportações brasileiras de carne de frango totalizaram 1,365 milhão de toneladas. O resultado é 5,1% superior ao registrado no mesmo período de 2019, quando foram exportadas 1,299 milhão de toneladas (ABPA, 2020). Estes dados demonstram a importância do agronegócio para o país, que mesmo com a Pandemia acerca do Covid-19, mantém o fluxo de exportações e fortalece o compromisso com a segurança alimentar das nações parceiras.

Com o objetivo de aumentar as exportações, o Brasil deve priorizar o status sanitário para garantir a qualidade do produto e segurança alimentar. Tendo isso em vista, toda a produção da avicultura já é acompanhada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), que avalia os autocontroles adotados pelas indústrias avícolas. Portanto, deve-se seguir em busca da excelência, emprego de altas tecnologias e investimentos em estruturas de produção com rígidos protocolos sanitários (BRASIL, 2016).

O Brasil, apesar dos problemas envolvendo a pandemia, é um dos maiores produtores de carne de frango do mundo. A projeção para esse ano é de crescimento das exportações devido ao impacto negativo da Influenza aviária em outros países, a preocupação com um possível desabastecimento pós pandemia e pela competitividade do produto brasileiro (ABPA, 2020). Em conclusão, a preocupação com sanidade na avicultura deve ser constante e eficaz, principalmente em relação ao controle de *Salmonella* spp. e resíduos de antimicrobianos.

3.2 *Salmonella* spp. NA AVICULTURA

Os cuidados com a sanidade avícola têm acompanhado e favorecido a evolução dos sistemas de produção, levando ao aumento da produtividade. Entretanto, existem patógenos que afetam o peso e a qualidade da carcaça, provocam prejuízos a avicultura e trazem riscos à saúde do consumidor. Dentre as bactérias que acometem os frangos, o gênero *Salmonella* merece atenção, devido à recorrência entre os produtores. O controle de *Salmonella* spp. é imprescindível por diversos fatores, tais como: saúde humana, legislação, mercado consumidor e saúde das aves (LUO et al., 2018).

O gênero *Salmonella* faz parte da família Enterobacteriaceae e forma um grupo complexo constituídos de duas espécies e seis subespécies, na forma de bacilos Gram negativos não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. A maioria é móvel, apresentando flagelos peritríquios, com exceção da *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, que são imóveis. É um patógeno clinicamente importante para humanos e animais e incluem mais de 2500 sorovares, porém menos de 100 sorotipos são responsáveis por infecções humanas (CDC, 2020).

As salmoneloses aviárias podem se apresentar como três enfermidades distintas: a pulrose, cujo agente é a *S. Pullorum*, o tifo aviário, causado pela *S. Gallinarum* e o paratifo aviário, causado por qualquer outra salmonela que não seja *S. Pullorum* ou *S. Gallinarum* (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

O gênero *Salmonella* é constituído de duas espécies geneticamente distintas: *S. entérica* e *S. bongori*, sendo o primeiro de maior destaque para a avicultura e saúde humana (BRASIL, 2011). A espécie *S. enterica* pode ser dividida em dois grupos, um grupo relacionado a sorovares que causam doenças sistêmicas específicas em aves e outro responsável por toxinfecções em humanos e animais. O primeiro grupo é representado pela *Salmonella Gallinarum* e pela *Salmonella Pullorum*, amplamente específicas para espécies aviárias e causam doenças septicêmicas, responsáveis por grandes perdas econômicas, devido à alta mortalidade e reduções na produtividade (BARROW; FREITAS NETO, 2011). O segundo grupo está representado por *Salmonella* paratífoides, como *S. Enteritidis*, *Typhimurium*, *Heidelberg*, entre outros, e estão relacionados à segurança alimentar, podendo causar doenças transmitidas por alimentos e ter um impacto negativo na saúde pública (PULIDO-LANDÍNEZ, 2019).

O MAPA por meio da Instrução Normativa SDA nº 20, de 21 de outubro de 2016, estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte, nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas e perus de corte e reprodução, registrados no serviço de Inspeção Federal, com o objetivo de reduzir a prevalência do patógeno, estabelecendo nível adequado de proteção ao consumidor nacional e internacional (BRASIL, 2016).

Para o controle de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas todos os lotes são submetidos a coletas de amostras para a realização de ensaios laboratoriais para detecção de salmonelas. As coletas são realizadas o mais próximo possível da data de abate, de tal maneira que os resultados sejam conhecidos antes de seu envio para o abate. Lotes com resultados positivos para *Salmonella* spp. seguem as normativas de abate sanitário da empresa e o que preconiza a Instrução Normativa nº 20/2016 (BRASIL, 2016).

3.3 USO DE ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO DE FRANGOS

Os antimicrobianos podem ser de origem natural ou sintética e atuam no tratamento e prevenção de doenças infecciosas de animais e humanos, através da destruição ou inibição do crescimento bacteriano (MENKEM et al., 2019). Quando utilizados em aves, no tratamento de doenças, reduz a incidência de patologias infecciosas que, conseqüentemente, melhoram o desempenho de crescimento dos animais, e assim, aumenta-se a produtividade (FURTULA et al., 2013).

Existem duas formas de administração do medicamento em frangos de corte, individualmente ou, mais frequentemente, em nível de lote. A administração individual possui a vantagem de apenas os animais doentes serem tratados, utilizando a dose correta. No entanto, em situações com um número grande de animais, se torna inviável, pois consome tempo e mão-de-obra e causa estresse aos animais. Por outro lado, o tratamento do lote é de fácil execução, pois é realizada na forma oral. Desta forma, um grande número de aves pode ser prontamente tratado e a medicação pode ser administrada nos estágios iniciais da doença (LANDONI; ALBARELLOS, 2015). A escolha do método adequado de aplicação do antimicrobiano, via água ou alimentação varia de acordo com o objetivo da aplicação (SAHU et al., 2014).

Entretanto, tanto a administração oral na água ou ração, não permite o controle da dose ingerida por cada indivíduo.

A utilização de antimicrobianos em aves pode ser para tratamento terapêutico, em que os animais infectados recebem a dose do antimicrobiano por um período relativamente curto. Outras formas de utilização são para efeito profilático e como promotores de crescimento, em que o antimicrobiano é administrado periodicamente por vários dias durante o ciclo de vida do frango de corte (SAHU; SAXENA, 2014). Esta prática pode resultar no uso excessivo de antimicrobianos e têm sido associados ao aumento da resistência microbiana observada em todo o mundo (LIN, 2014; WHO, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a restrição do uso de classes de antimicrobianos importantes na medicina humana para fins de promoção de crescimento em animais produtores de alimento (WHO, 2017). No Brasil, alguns antimicrobianos que possuem finalidade de aditivos melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos, como tilosina, lincomicina, virginamicina, bacitracina e tiamulina estão proibidos, conforme informação publicada na Portaria nº 171 (BRASIL, 2018). Embora haja algumas restrições com essa prática, ela ainda é permitida para outras drogas.

Os antimicrobianos podem ser divididos em várias classes, de acordo com sua estrutura química ou mecanismos de ação. Os principais grupos de antimicrobianos utilizados na veterinária são: Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Sulfonamidas, Tetraciclina, Cloranfenicol, β -Lactâmicos e Quinolonas.

3.4 AMOXICILINA

A amoxicilina (α -amino-*p*-hydroxybenzylpenicillin) está inserida no grupo dos beta-lactâmicos e é um antimicrobiano de amplo espectro, tendo como microrganismo-alvo uma grande variedade de espécies Gram-positivas e Gram-negativas (SUTHERLAND et al., 1972) Os beta-lactâmicos são um grupo de antibióticos que se define pela presença do anel beta-lactâmico, responsável pela sua ação antimicrobiana (RANG et al., 2016).

Os antibióticos beta-lactâmicos interferem na síntese dos peptidoglicanos. Depois de se fixarem às proteínas de ligação à penicilina nas bactérias, inibem as

transpeptidases presentes na estrutura do peptidoglicano. Então, ocorre a inativação de um inibidor de enzimas autolíticas na parede celular, ação bactericida através da lise da bactéria (RANG et al, 2016).

Algumas bactérias produzem uma enzima chamada penicilinase, enzima capaz de quebrar o anel β -lactâmico. Uma vez que as penicilinas contêm esse grupo β -lactâmico em sua estrutura básica, a ruptura desse anel promove a inativação do antibiótico. Desta forma, algumas bactérias são resistentes a antibióticos que possuem o anel β -lactâmico (FIORAMONTI; CAVALHEIRO, 2012).

A amoxicilina, juntamente com a ampicilina, tem a atividade antimicrobiana ampliada para incluir determinados microrganismos Gram negativos. Esses fármacos devem ser administrados com um inibidor de beta-lactamase, tais como clavulanato ou sulbactam, para impedir a hidrólise por beta-lactamases de amplo espectro pois não apresentam resistência a beta-lactamase (GOODMAN; GILMAN, 2010).

3.5 QUINOLONAS

As quinolonas são antimicrobianos sintéticos amplamente utilizados no tratamento de doenças infecciosas tanto em humanos, como em animais (ZHANG et al., 2011; LEE et al., 2014). A primeira quinolona a apresentar atividade antibacteriana foi o ácido nalidíxico e estudos sistemáticos de modificação em sua molécula produziram compostos que aumentaram a potência e o espectro de ação, ampliando as aplicações terapêuticas das quinolonas (WAGMAN et al., 2017).

As fluoroquinolonas constituem a segunda geração de quinolonas e diferem destas por possuírem um átomo adicional de flúor em sua estrutura química. Esta combinação levou ao aumento no espectro de ação, e na capacidade de penetração na parede bacteriana. Como consequência houve uma melhora na atividade contra bactérias Gram-negativas, passando a abranger algumas espécies Gram-positivas (SOUZA, 2005).

Devido seu grande espectro de ação as fluoroquinolonas estão entre as classes de antibióticos mais utilizadas no tratamento de doenças no Brasil (WHO, 2018; MATTOS et al., 2017; CARNEIRO et al., 2011; DEL FIOLE et al., 2010). Um relatório sobre o consumo de antibióticos no mundo divulgado pela OMS demonstra um elevado consumo das fluoroquinolonas em vários países (WHO, 2018).

Em um estudo descritivo feito no Japão sobre as prescrições médicas de antibióticos no país, indica que as cefalosporinas, macrolídeos e quinolonas foram responsáveis por 85,9% de todas as prescrições de antibióticos (HASHIMOTO et al., 2020). Na Índia, um estudo avaliou as prescrições de antibióticos e as quinolonas foram os antibióticos mais frequentemente prescritos (11,7%) (AVCI et al., 2006). A elevada incidência de prescrições de quinolonas foi observado também na Hungria (SZABO; BÖRÖCZ, 2014), Taiwan (KUO et al., 2020), Egito (AHMED et al., 2016) e Portugal (PINTO; RAMALHINHO, 2018).

3.5.1 Enrofloxacin

A enrofloxacin (ENR) (1-ciclopropil -7- (4- etilpiperazina -1-il) -6- fluoro - 4-oxo -1,4 -dihidroquinolina - 3 - ácido carboxílico pertence ao grupo das Fluoroquinolonas. A ENR é considerado uma quinolona de 2ª geração por possuir uma combinação de um átomo de flúor (posição 6) e um grupo piperazinil (posição 7) (LOPEZ e OLVERA, 2000).

Além de sua ampla utilização em doenças ocasionadas em humanos, a classe das quinolonas também é bastante utilizada na veterinária (PANZENHAGEN et al., 2016). Como outras fluoroquinolonas, a ENR exibe um amplo espectro de atividade antibacteriana, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A ENR foi desenvolvida exclusivamente para uso em animais, sendo comumente utilizada na produção de aves no Brasil (GOUVÊA et al., 2015).

De acordo com o Compêndio de Produtos Veterinários (SINDAN, 2020), existem 14 produtos de ENR registrados no Brasil. A forma de administração da ENR é por água de bebida e na Tabela 1 estão contidos os nomes comerciais, dosagem adequada para tratamento de Salmoneloses em frangos de corte e o tempo de carência para cada produto.

Tabela 1 - Informações sobre administração de diferentes produtos de ENR comercial.

Produto	Tempo de administração (dias)	Dose µg/kg	Tempo de carência (dias)
Baytril solução 10%	3	10	7
Chemitril solução oral 10%	3	10	4
Danetril	3	10	7
Enflox	3	10	10
Enro Flec 10% líquido	3 a 5	10	7
Enrofloxacin 50% Interchange	5	10	2
Enrofloxacin solução 20%	3 a 5	10	2
Enromic oral	5	10	10
Enrotec 100	5	10	10
Floxagen oral	3 a 5	10	7
Floxin oral	5	10	13
Fluoquin pó solúvel	5	10	8
Fluoquin solução	5	10	8
Neoflox 10% solução oral	3 a 5	10	7

Fonte: SINDAN, 2020

O principal metabólito ativo da ENR é a Ciprofloxacina (MORALES-GUTIÉRREZ et al., 2015) sendo considerado um antimicrobiano de importância crítica para uso em medicina humana (BEUC, 2014).

3.5.2 Ciprofloxacina

A ciprofloxacina foi a primeira quinolona que apresentou atividade significativa fora do trato urinário humano (EMMERSON; JONES, 2003; STEIN, 1998). A ciprofloxacina é usada para tratar uma variedade de infecções ocasionados por bactérias Gram-negativas e, em menor grau, Gram-positivas (ANDRIOLE, 2005; MITSCHER, 2005).

3.6 RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS

A resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. é um problema crescente e se tornou uma ameaça à saúde pública em todo o mundo. A maioria das cepas de *Salmonella* sp. desenvolveu resistência contra múltiplas drogas devido às suas

aplicações abusivas indiscriminadas e repetidas (SINGH et al., 2013; PANZENHAGEN et al., 2016; CHUAH et al., 2018; LUO et al., 2018).

Com isso, há um sério risco de saúde pública, devido à redução de opções de fármacos efetivos para o tratamento de infecções e aumento das complicações clínicas de pacientes hospitalizados. Além disso, a sensibilidade reduzida aos fármacos pode prolongar o tempo de estadia hospitalar, elevando os custos direcionados à recuperação dos pacientes doentes e com saúde pública (BEN, 2019, WHO, 2018).

A resistência antimicrobiana se deve à presença de vários mecanismos de resistência geneticamente determinados, que podem ser adquiridos ou mutados. A resistência adquirida ocorre quando bactérias naturalmente susceptíveis incorporam genes que codificam mecanismo(s) de resistência via mutação ou transferência de material genético de outra bactéria, da mesma espécie ou espécies diferentes (MCGOWAN; MACNAUGHTON, 2017).

Esses genes são transferidos por plasmídeos, que são moléculas circulares de DNA de cadeia dupla independente do cromossomo, ou por transposons, que são sequências móveis de DNA que podem se mover para diferentes posições no genoma.

A transferência pode ocorrer de diferentes formas, através da conjugação, transdução ou transformação. A conjugação ocorre através do contato direto célula a célula com transferência de plasmídeo. Já a transdução ocorre através da transferência de DNA bacteriano por um bacteriófago, um vírus bacteriano que se replica na célula bacteriana e pode incorporar um fragmento de DNA bacteriano na partícula viral montada. Esse DNA bacteriano é então transferido para a próxima célula bacteriana que o vírus infecta e transformado por meio da captação de DNA livre do meio ambiente (COSTELLOE et al., 2010).

Os antibióticos após serem administrados para o controle de patógenos, acabam gerando uma pressão seletiva em favor de bactérias que possuem mecanismos de resistência, e apresentam uma vantagem de sobrevivência, sendo capazes de transmitir os genes de resistência a outras bactérias (MCGOWAN; MACNAUGHTON, 2017).

Além dos determinantes genéticos de resistência aos antibióticos, existe também o mecanismo enzimático. A inativação do fármaco pode ocorrer a partir da produção, de enzimas bacterianas que degradam ou inativam o antibiótico. Os tipos

de reações enzimáticas, envolvem: hidrólise, transferência de um grupo químico ou processo de oxi-redução. O exemplo clássico do mecanismo enzimático de resistência é a produção de β -lactamase que hidrolisa o anel β -lactâmico das penicilinas (KUMAR; VARELA, 2013; RANG et al., 2016).

No tratamento de doenças ocasionadas por bactérias é crucial ter-se a compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência ao antibiótico para o uso clínico inteligente dos medicamentos e no desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos (WHO, 2018).

Recentemente, a prevalência crescente de *Salmonella* spp. resistente a múltiplas drogas e a resistência a agentes antimicrobianos clinicamente importantes, como fluoroquinolonas e beta-lactâmicos, têm sido um problema emergente em todo o mundo (NADI et al., 2020; KIM et al., 2012).

3.4.1 Mecanismos de resistência a quinolonas

A resistência à quinolona é mais frequentemente associada a alteração na suscetibilidade de seus alvos, através da aquisição de mutações cromossômicas, que levam a substituições de aminoácidos, nos genes que codificam a girase e topoisomerase IV. Dessa forma, alteram o local de ligação à quinolona e resultam em falha de sua atividade antibacteriana (FERRARI et al., 2013; ALDRED et al., 2014). Envolvidas na replicação do DNA, a girase é composta pelas subunidades A e B, que são codificadas por *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A topoisomerase IV é codificada por *parC* e *parE*, as regiões desses genes que interagem com as quinolonas são conhecidas como regiões determinantes da resistência à quinolona (CORREIA et al., 2017).

O efeito bacteriostático das quinolonas ocorre quando a droga está presente em baixas concentrações e então há a inibição das topoisomerasas tipo II, podendo ser reversível. Entretanto, quando presente em altas concentrações, há o efeito bactericida, através da dissociação da topoisomerase do DNA e/ou a resposta bacteriana à quebra de dupla fita levam finalmente à morte celular. Desta forma, o DNA com dupla quebra não pode ser replicado (ALDRED et al., 2014).

Outro mecanismo de resistência que ocorre na classe das quinolonas é o acúmulo intracelular reduzido devido ao aumento do efluxo da droga ou permeabilidade reduzida. Para atingir seus alvos no citoplasma celular, as

fluoroquinolonas devem atravessar a membrana citoplasmática e, nas bactérias Gram-negativas, a membrana externa também. As bombas de efluxo são capazes de bombear ativamente a droga do citoplasma e por isso há uma prevenção do acúmulo de antimicrobianos no interior das células bacterianas (AUDA et al., 2020; LI et al., 2019).

Além dos mecanismos já descritos, há também o mecanismo de resistência à quinolona mediada por plasmídeo (PMQR), que foram identificados como: proteção do alvo mediada por *qnr*; modificação de quinolonas através de *aac(6')-Ib-cr* e bombas de efluxo de quinolona mediadas por plasmídeo (*QepA* e *OqxAB*). A PMQR pode ser transmitida horizontalmente (conjugação bacteriana) e verticalmente (geração em geração), diferente do mecanismo mediado por alvo, que só é transmitido verticalmente (CORREIA et al., 2017; ALDRED et al. 2014).

Geralmente, plasmídeos que carregam genes de resistência reduzem a suscetibilidade às quinolonas, mas não ao nível clínico de resistência (HOOPER; JACOBY, 2015). Porém, associados a outros mecanismos podem ter efeito potencializado na diminuição da suscetibilidade a essa droga, causando resistência (FERRARI et al., 2013).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um processo natural. O fato foi revelado dois anos após a introdução da penicilina, período em que bactérias resistentes foram detectadas na medicina (UMBER; BENDER, 2009). Os genes de resistência podem estar presentes nos cromossomos bacterianos. Mas, o principal problema é a migração destes genes no ecossistema através dos plasmídeos (CARATOLLI, 2013).

A microbiota intestinal do frango abriga uma rica coleção de genes, que provavelmente incluirá muitas sequências de interesse científico e potencial biotecnológico (SERGEANT et al., 2014). Um dos interesses está relacionado aos genes determinantes de resistência a antibióticos, já que o TGI de frangos é considerado um reservatório para esses genes (ZHOU; WANG; LIN, 2012).

Zou, Wang e Lin (2012) realizaram um estudo de caracterização de genes de resistência a antibióticos do microbioma intestinal de frangos, identificando diversos genes de resistência para diferentes classes de antibióticos. Outro estudo realizado por Tong et al. (2017), mostra que diversos genes de resistência foram identificados nas fezes de frangos, destacando a prevalência desses genes e propondo mais estudos sobre os riscos à saúde pública.

3.7 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM CARNE DE FRANGO

A presença de resíduos de uso veterinário em carnes ocorre quando estas são utilizadas por via parenteral ou oral ou como aditivos alimentares na nutrição animal (BIWAS et al., 2010). Em geral a administração de antimicrobianos, para o tratamento de doenças, em frangos de corte é via água de bebida. Estudos sobre o tempo de carência de ENR em frangos de corte administraram 10 mg/kg do medicamento por via oral, em intervalos de 24 horas, durante 5 dias consecutivos (BONASSA et al., 2017; ASSIS et al., 2015; SAN MARTIN et al., 2009). Indicações de fabricantes do medicamento também recomendam essas condições de tratamento.

Em aves, antimicrobianos e antiparasitários são usados extensivamente para prevenção e tratamento de doenças (GOETTING et al., 2011). A utilização excessiva do medicamento para esses fins, leva ao acúmulo de resíduos na carne para consumo.

Para proteger a saúde humana, os limites máximos de resíduos (LMR) para os fármacos são estabelecidos pelas agências reguladoras. Além disso, devem ser determinados os períodos de carência de antimicrobianos, de forma ampla e individual nos valores de LMR nos tecidos-alvo (músculo, pele/gordura, fígado e rim) de cada espécie animal. Assim, se os níveis de resíduos antimicrobianos nos tecidos-alvo estão abaixo dos valores de LMR estabelecidos, considera-se que a sua presença em alimentos não representa um risco para saúde do consumidor (ANADÓN et al., 2012; BONASSA et al., 2017).

Existe um quadro legislativo rigoroso que controla o uso de substâncias antimicrobianas. A União Europeia através do *Commission Regulation* nº 37 (EU, 2010), o Brasil através da Instrução Normativa nº 51/2019 (BRASIL, 2019) e o Japão através do The Japan Food Chemical Research Foundation (JFCRF, 2017), determinam o LMR para a soma de ENR e CIP (Tabela 2).

Tabela 2 - LMR para a soma de ENR e CIP em diferentes países

Tecido	Concentração de CIP+ENR (µg/kg)		
	Brasil	União Europeia	Japão
Músculo	100	100	50
Fígado	200	200	100
Rim	300	300	100

Fonte: EU (2010); BRASIL (2019); JFCRF (2017)

Quando um medicamento é administrado, parte dele é absorvida pelos tecidos e parte é metabolizada ou excretada diretamente pelas fezes e urina, seja na forma original do medicamento, seja em forma de metabólitos ativos e/ou não ativos (AWAD, 2014). Não há legislação que regule a presença de resíduos de medicamentos nas excretas dos animais. O uso dessas como fertilizantes, podem representar rotas de exposição do antimicrobiano no ambiente com sua presença em lagos, solo e absorção por plantas (JIA et al., 2017). Com isso, há a transferência de resíduos de antibióticos e o contato excessivo com microrganismos presentes no ambiente, desencadeando resistência a esses compostos.

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA PESQUISA DE ANTIMICROBIANOS

Os métodos analíticos para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal devem ser capazes de detectar com segurança a presença de uma substância de interesse. Além disso devem identificar de forma inequívoca o analito de interesse e determinar sua concentração à níveis aceitáveis de recuperação (LOPES et al., 2013).

Os métodos analíticos para a detecção de resíduos de antibióticos podem ser divididos em dois grupos: triagem e confirmação. Métodos de triagem podem ser de natureza qualitativa ou semi-quantitativa, e são utilizados para identificar a presença (ou ausência) de resíduos, em amostras de um lote, cuja concentração exceda o LMR ou outro limite que implique ações regulatórias por parte de uma autoridade competente (EBRAHIMPOUR et al., 2015).

Esses métodos de triagem não fornecem informações estruturais suficientes para definir com precisão a concentração da substância presente, no entanto, podem ser utilizados para determinar rapidamente se as amostras analisadas requerem testes adicionais ou se podem ser liberadas. Os métodos de triagem devem apresentar uma taxa de resultados falso-negativos inferior a 5% de acordo com a Decisão 2002/657/EC, e não devem ser utilizados isoladamente para fins de controle de resíduos em amostras oficiais sem que haja disponibilidade de métodos quantitativos e/ou confirmatórios devidamente validados para serem aplicados a quaisquer amostras identificadas como potencialmente não conformes em relação a um LMR estabelecido (EC, 2002; CODEX, 2009).

Os métodos quantitativos fornecem informação quantitativa que pode ser usada para determinar se os resíduos presentes em uma determinada amostra excedem o LMR, mas não permitem a confirmação inequívoca da identidade do resíduo. Esses métodos devem apresentar um bom controle estatístico dentro da faixa de trabalho na qual se enquadra o LMR ou limite de ação regulatória (CODEX, 2009).

Dentre os principais métodos de análises de resíduos de antibióticos estão os ensaios imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay), utilizado normalmente para ensaios de triagem e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), utilizada como método confirmatório (LANÇAS, 2013; ZHANG, 2011; SKOOG et al., 2002).

As técnicas imunológicas, especialmente o ensaio imunoenzimático, estão cada vez mais sendo utilizadas como métodos alternativos e/ou complementares na análise de resíduos em função de sua rapidez, custo-benefício, portabilidade e aplicabilidade, principalmente como métodos de triagem. Esse método se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas (ZHANG, 2011).

A análise cromatográfica consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. Na cromatografia líquida, a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é percorrida pela fase móvel. As forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e, portanto, a separação dos solutos individuais (SKOOG et al., 2002).

O sistema CLAE é constituído basicamente por um reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, um sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica, sistema de detecção e um sistema de registro e tratamento dos dados. Por meio do sistema de injeção, a amostra é carregada pela fase móvel até a coluna, no qual é realizado o processo de separação. O efluente da coluna segue então para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos da coluna. O sinal gerado pelo detector é captado, tratado no computador, e um cromatograma é montado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (DONG, 2006; SNYDER; KIRKLAND, 2009).

A determinação de antibióticos usando métodos analíticos envolve a etapa de preparo de amostras, que inclui a extração de analitos da matriz e limpeza dos analitos

de qualquer presença de co-analitos na matriz. Dentre os métodos de extração mais utilizadas estão a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (SPE) e a extração rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura, conhecida como QuEChERS - Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe (KOLE et al., 2011).

A LLE é conhecida como extração por solvente e particionamento. Os pesticidas são dissolvidos em dois líquidos imiscíveis diferentes, geralmente água e solvente orgânico. A eficiência do método depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (KOLE et al., 2011).

A extração SPE emprega adsorventes recheados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de adsorvente, com 40-60 mm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros. Em geral, os procedimentos de SPE contêm 5 etapas: i) ativação do adsorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; ii) condicionamento do adsorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; iii) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; iv) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; v) eluição e coleta do analito (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

O método QuEChERS é uma técnica que oferece várias vantagens sobre outras extrações, pois é realizada com rapidez, facilidade e segurança, como o próprio nome indica, usando solventes não halogenados e simples metodologia. Esse método envolve extração líquido-líquido, particionamento utilizando acetonitrila, seguido de purificação por extração em fase sólida. É amplamente utilizado para determinar resíduos devido à sua simplicidade, baixo custo e eficiência relativamente alta (PÉREZ-BURGOS et al., 2012).

3.8.1 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas permite um aumento de seletividade e sensibilidade, proporcionando o

monitoramento de centenas de resíduos em uma única análise (PANZENHAGEN et al. 2016).

Os componentes básicos de um espectrômetro de massas são a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector. Na fonte de íons, a fase móvel eluente do sistema de CLAE, na qual se encontram os analitos de interesse, passa por um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Pode ser operado no modo positivo ou negativo, dependendo da molécula a ser analisada. Na saída do capilar são formadas gotículas altamente carregadas e ocorre a repulsão entre as cargas similares para formação de íons (VÉKEY, 2001; SMERAGLIA et al., 2002).

Os íons formados são transferidos para o analisador de massas, que são separados devido a sua relação massa e carga (m/z). Dentre os analisadores disponíveis, o mais aplicado nas análises de resíduos em produtos de origem animal é do tipo quadrupolo (LANÇAS, 2013).

O quadrupolo é composto de quatro barras metálicas cilíndricas, com potenciais elétricos distintos para cada par da barra metálica, onde uma corrente é aplicada, somente os íons que apresentarem determinada razão m/z , irão passar pelas barras e atingir o detector (LANÇAS, 2009).

3.8.2 Parâmetros de validação analítica

A validação de métodos analíticos tem como objetivo demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida, garantindo confiabilidade dos resultados. Os parâmetros de desempenho necessários para a validação de métodos analíticos para a pesquisa de resíduos à níveis traços são: linearidade, seletividade, precisão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (EC, 2002; BRASIL, 2011b).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados, antes de fazer a regressão linear (BRASIL, 2011b; ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

A seletividade é a capacidade que o método possui em identificar o analito, assegurando que não há interferentes. A seletividade pode ser avaliada através de ensaios com padrões ou materiais de referência, análise de amostras com e sem a presença do analito (padrão) ou utilização de outra técnica específica para a substância de interesse que permite comprovar a seletividade (EC, 2002).

A precisão pode ser avaliada em condições de repetitividade ou reprodutibilidade, através do desvio-padrão dos resultados. A repetitividade é caracterizada pela utilização dos resultados obtidos por análises sucessivas da mesma amostra pelo mesmo método e condições. A reprodutibilidade é avaliada utilizando uma mesma amostra e método, mas em diferentes laboratórios, equipamentos ou analistas (SOUZA et al., 2016).

A recuperação de um método analítico é capacidade de um método para extrair um analito da matriz. Expressa a proximidade dos resultados obtidos em relação ao verdadeiro valor contido na amostra (GONZÁLEZ et al. 2014).

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito que pode ser detectada pelo método analítico, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis pelo método analítico. O valor de LQ é dado pela concentração do analito que fornece um sinal pelo menos 5 vezes maior que o do ruído de fundo (GONZÁLEZ et al., 2014).

A robustez trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento a sua precisão (BRASIL, 2011b).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Os reagentes utilizados foram metanol, acetonitrila, ácido fórmico, acetato de sódio anidro e sulfato de sódio (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA), ácido acético glacial (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) e fase dispersiva contendo C-18 e PSA (Agilent

Technologies[®], Santa Clara, EUA). Todos os solventes utilizados neste estudo cromatográfico foram de grau HPLC e a água foi purificada por passagem através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

Os padrões analíticos de ENR, CIP e ENR d5 (ENR-d5, padrão interno) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, EUA). Também foram utilizados filtros de nylon com porosidade de 0,22 µm (Millex[®], Darmstadt, Alemanha).

4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO

As soluções padrão estoque foram preparadas individualmente para cada composto na concentração de 100 µg/mL, dissolvendo cada padrão em metanol e estocados a -20 °C. As soluções padrão de trabalho foram diluídas a partir da solução estoque em solução de água-metanol (80:20 v/v) até a concentração final de 0,8 µg/mL para cada composto. As soluções de trabalho foram estocadas a temperatura de 2-8 °C.

4.3 MÉTODO ANALÍTICO E VALIDAÇÃO

4.3.1 Preparo das amostras

Amostras controle de músculo, fígado e rim foram pesadas ($2 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$) em tubo para centrífuga de 50 mL. Em seguida foram adicionados 200 µL do padrão interno (ENR-d5) para obter uma concentração de 80 µL/kg e as soluções de trabalho de ENR e CIP (50 a 300 µL, dependendo do nível de concentração desejada). As amostras foram mantidas protegidas da luz por 30 min em temperatura ambiente. Um volume de 10 mL da solução de água:acetonitrila (80:20 v/v), acidificada com 5% de ácido acético glacial, foi adicionada aos tubos contendo as amostras. Os tubos foram agitados manualmente por 1 min e posteriormente foram adicionadas 4 g de Na₂SO₄ e 1 g de acetato de sódio. Após agitação dos tubos manualmente por 1 min, as amostras foram centrifugadas a 2880 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para os tubos de 2 mL contidos no kit dispersivo, composto por C-18 e PSA. Os tubos foram agitados em vortex por 30s e novamente centrifugados a 18407 x g por 20 min

a 4 °C. Os extratos foram coletados e filtrados em filtros de nylon de 0,22 µm e então injetados no LC-MS/MS.

4.3.2 Condições cromatográficas

A separação por cromatografia e detecção por espectro de massas (LC-MS/MS) foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida 1260 Infinity acoplado a um triplo quadrupolo Agilent 6460 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Foi utilizado a coluna cromatográfica Agilent SB C18 (100 mm × 3,5 mm, 2,1 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA).

Para definição dos parâmetros cromatográficos, as soluções padrão dos analitos foram preparadas individualmente e injetadas. As condições determinadas para cada analito estão apresentadas na Tabela 3. As seguintes configurações também foram aplicadas à fonte de ionização: voltagem do capilar, 4000 V; temperatura, 325°C; fluxo de gás (N₂), L/min.

Tabela 3 - Transições MRM e condições do espectrômetro de massas utilizadas para cada analito

Analito	Íon precursor	Íons produto	F (V)	CE (V)
Enrofloxacina	360.2	342.2 ^a	120	15
		316.2 ^b		
Ciprofloxacina	332.1	314.1 ^a	120	12
		231.1 ^b		
Enrofloxacina d5	365.2	347.1 ^a	120	30
		245.0 ^b		

Abreviações: F: fragmentador; CE: Energia de colisão;

^a íon de quantificação;

^b íon de confirmação

Fonte: Autor (2020)

As fases móveis utilizada no experimento foram 0,1% v/v de ácido fórmico em H₂O (A) e 0,1% v/v de ácido fórmico em metanol (B). O fluxo foi mantido constante a 0,6 mL/min, conforme gradiente apresentado na Tabela 4. O volume de injeção foi de 3 µL.

Tabela 4 - Gradiente das fases móveis

Tempo de corrida (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
2	70	30
3	0	100
4	80	20
6	80	20

Fonte: Autor (2020)

A fonte de ionização AJS ESI foi operada em modo positivo. As condições do espectrômetro de massas foram primeiramente otimizadas com injeções dos padrões para selecionar o íon precursor e os íons produto resultantes da fragmentação; e para a seleção do fragmentador (F) e energia de colisão (CE) para cada analito. Essa otimização foi conduzida por injeção de soluções padrão a 20 ng/mL de cada analito, preparada por diluição das soluções de estoque com água:metanol (50:50 v/v).

4.3.3 Parâmetros de validação

Os procedimentos de validação do método desenvolvido foram realizados de acordo com a Comissão de Decisão Europeia 2002/657/CE (EC, 2002), as orientações sobre validação de métodos analíticos do INMETRO (BRASIL, 2011b) e as diretrizes para o projeto e implementação do programa nacional de garantia de segurança alimentar associado ao uso de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos (CODEX, 2009). Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção, $CC\alpha$ e $CC\beta$.

4.3.3.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade foram analisadas amostras brancas de músculo, fígado e rim de frangos de corte fortificadas com as soluções padrão dos antimicrobianos nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e adicionado padrão interno (ENR-d5) na concentração de 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em todas as amostras. Foram realizadas seis repetições em três dias consecutivos. Foram construídas curvas relacionando área do pico versus concentração e, por regressão linear, foram

definidas as equações das curvas e os coeficientes de determinação (R^2) e correlação (r).

4.3.3.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada verificando a presença ou ausência de compostos interferentes eluindo nos mesmos tempos de retenção que os analitos de interesse.

4.3.3.3 Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) em condições de repetitividade e reprodutibilidade intra-laboratorial. Para a avaliação da repetitividade foram realizadas análises sucessivas da mesma amostra, em curtos intervalos de tempo e efetuadas sob as mesmas condições (equipamentos e mesmo analista). Desse modo, as amostras foram fortificadas em três níveis de concentração: 20, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Os valores foram estabelecidos com base no LMR, considerando a metade do menor valor para todos os tecidos, uma vez que o LMR é estabelecido para a soma de CIP+ENR (BRASIL, 2019). As análises foram realizadas em seis replicatas cada e três dias consecutivos. A reprodutibilidade foi avaliada da mesma forma, porém por um segundo analista. As recuperações foram calculadas por interpolação de cada razão da área de pico do analito pelo padrão interno, nas curvas de calibração correspondentes. A concentração calculada foi subsequentemente dividida pelo valor teórico, a fim de obter a recuperação (EC, 2002; CODEX, 2009).

4.3.3.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD, definido como a menor concentração que o método analítico pode diferenciar de forma confiável dos ruídos, foi estimado como o valor igual à metade do LQ. Seis amostras de músculo, fígado e rim foram fortificadas a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, uma relação sinal-ruído de 3 ou superior caracterizou nível mínimo de concentração detectável. O LQ foi escolhido como o primeiro nível de concentração avaliado na curva de calibração. Seis amostras fortificadas a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foram preparadas em três dias diferentes, juntamente com as curvas de calibração. As recuperações foram avaliadas

tomando como referência os limites aceitáveis determinados pelo Codex para cada analito (BRASIL, 2011b; CODEX, 2009).

4.3.3.5 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

O $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram calculados a partir dos resultados da análise de vinte matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR. O $CC\alpha$ foi determinado como a concentração no nível de LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão nesse nível, tomado como 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para todos os analitos. O $CC\beta$ foi calculado como a concentração correspondente ao valor do limite de decisão ($CC\alpha$) mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intra-laboratorial (EC, 2002).

4.4 DEPLEÇÃO DE ENR E CIP TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE

4.4.1 Criação das aves

Este estudo foi realizado de acordo com os requisitos éticos e autorizado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), protocolo número 004/2020.

Foram alojados 120 frangos com um dia de idade (*Gallus gallus domesticus*, Cobb®), em granja experimental de uma agroindústria no estado de Santa Catarina. A densidade foi mantida abaixo de 39 kg/m^2 (ABPA, 2016). Após o alojamento, os frangos foram mantidos para aclimação a temperatura de 25 ± 5 °C com 50-60% de umidade relativa e com livre acesso à ingestão de água. O alimento fornecido estava de acordo com as exigências de nutrientes preconizadas para frangos de corte e livre de qualquer droga antimicrobiana.

4.4.2 *Design* experimental

Os frangos foram alojados em três grupos, o grupo do tratamento A (controle) e o grupo do tratamento B (ENR). Após 32 dias de criação das aves foi iniciado o tratamento com antimicrobiano comercial. O antimicrobiano foi fornecido durante 5

dias consecutivos aos frangos de corte, via oral, por meio da água de bebida, na dosagem de 10 mg/kg de ENR.

Oito frangos de cada tratamento foram eutanasiados através da injeção, por via intravenosa, do anestésico Tiopental (150 mg/kg), nos dias 1 a 10 após o tratamento com o antimicrobiano. Para o tratamento controle as coletas dos tecidos ocorreram nos dias 1, 3, 5, 7 e 10. Foram coletados os dois rins, fígado (limpo sem vesícula biliar) e músculo (peitoral maior) separadamente e armazenados a -20 °C até análise em LC-MS/MS.

A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância e as médias comparadas pelo teste t de Tukey com nível de 5% de significância ($P < 0,05$) (JASP Team, 2020).

4.5 EXPERIMENTO DE RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS

4.5.1 Coleta das amostras

Um total de 124 amostras de fezes de frangos de corte, foram coletados de três aviários diferentes da região norte do estado do Paraná. Os frangos apresentaram as mesmas características de idade do lote, alimentação e tratamento. Os frangos foram tratados previamente à coleta com narasina, nicarbazina, tilosina, monensina, enramicina na alimentação. As amostras foram coletadas em frascos coletores universal assépticos e enviadas imediatamente ao laboratório sob condições assépticas e processadas para isolamento de *Salmonella* spp.

4.5.2 Isolamento e tipificação de *Salmonella* spp.

Para isolamento de *Salmonella* spp. das fezes, a metodologia seguiu os procedimentos descritos na Portaria nº 126/1995 (BRASIL, 1995). As amostras foram pesadas (5 ± 1 g) e adicionados 50 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas por 18-24 horas em estufa a 36 ± 1 °C. Posteriormente, foram realizadas as etapas de enriquecimento seletivo em caldo Tetracionado e caldo Rappaport–Vassiliadis incubados a 42-43 °C por 18 a 24 horas. Após, as amostras passaram para a etapa de isolamento em Ágar Verde Brilhante e Ágar Hektoen e novamente incubadas à

temperatura de 35 a 37 °C por 18 a 24 horas. As colônias típicas de *Salmonella* spp. passaram pelas etapas de bioquímica preliminar e complementar e após comportamento bioquímico compatível, as cepas foram caracterizadas antígenicamente através do teste de aglutinação rápida e seu sorovar foi identificado por *Microrray Check & Trace Salmonella*®.

4.5.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos comerciais

As amostras de fezes foram pesadas (5 ± 1 g) e pré-enriquecidas com 50 mL de caldo BHI e incubadas em estufa a 36 ± 1 °C por 18 - 24h. Posteriormente, foi transferida a alíquota de 1 mL para um tubo contendo 9 mL de Água Peptonada Tamponada 1% (APT) com Amoxicilina na concentração de 20 mg/L e 1 mL para outro tubo contendo APT com ENR na concentração de 10 mg/L, realizado em triplicata. As soluções foram incubadas a 36 ± 1 °C por 18 a 24 horas. Posteriormente, as amostras passaram pelas etapas de isolamento de *Salmonella* spp. conforme Portaria MAPA nº 126/1995 (BRASIL, 1995) para verificar se houve crescimento do micro-organismo após contato com os antimicrobianos.

Em paralelo, a alíquota de 1 mL das fezes pré-enriquecidas com caldo BHI foram transferidas para o caldo Tetracionato e 0,5 mL para caldo Rappaport-Vassiliadis conforme descrito no item 4.5.2 para isolamento de *Salmonella* spp. Após isolamento, as cepas de *Salmonella* spp. foram padronizadas em solução salina (NaCl a 0,85% m/v) até obter a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, através de turbidímetro (Highmed HMTDP-1000) até atingir 0,5 na escala de McFarland. Após, foram transferidos 1 mL da solução em 9 mL de APT 1% contendo Amoxicilina na concentração de 20 mg/L e mais 1 mL para solução de APT com Enrofloxacin na concentração de 10 mg/L. As soluções foram incubadas a 36 ± 1 °C por 18-24 horas. A sensibilidade foi avaliada conforme turbidez dos tubos após incubação, cuja turbidez indicou crescimento de *Salmonella* sp. após contato com os antimicrobianos. Os tubos sem turbidez foram semeados em placas de Ágar Nutriente para confirmação de ausência de *Salmonella* spp.

4.5.4 Teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão

Para o perfil de resistência aos antibióticos as cepas de *Salmonella* spp. previamente reativadas em caldo Trypticase de Soja (TSB) foram padronizadas a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (equivalente a 0,5 na escala de MCFarland). A semeadura do inóculo foi realizada por swab em placas contendo Agar Müller-Hinton e os discos colocados sobre a sua superfície conforme a norma de padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por Disco-difusão (CLSI, 2003). Foram utilizados os discos de amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, canamicina, gentamicina, neomicina, ceftiofur, colistina, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacina, fosfomicina, lincomicina + espectomicina e tetraciclina. Os antibióticos foram escolhidos de acordo um levantamento realizado em estabelecimentos avícolas, indicando os antimicrobianos mais utilizados no tratamento de frangos de corte (PARANÁ, 2005).

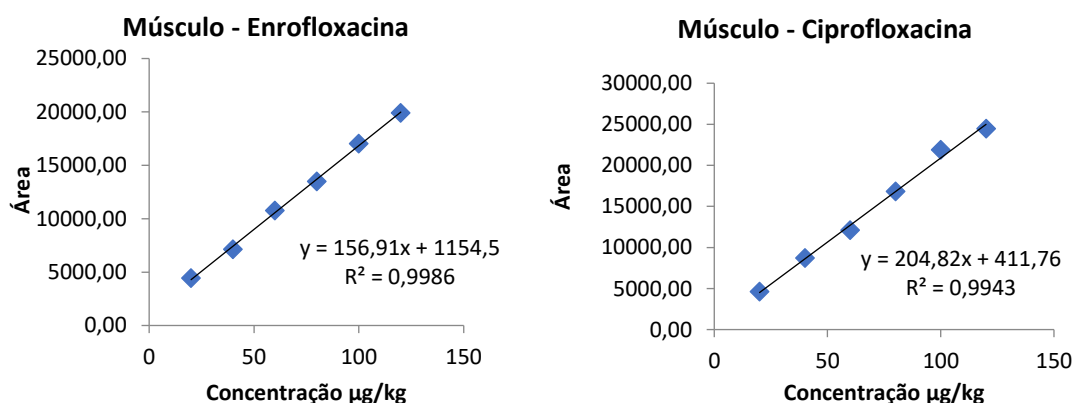
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

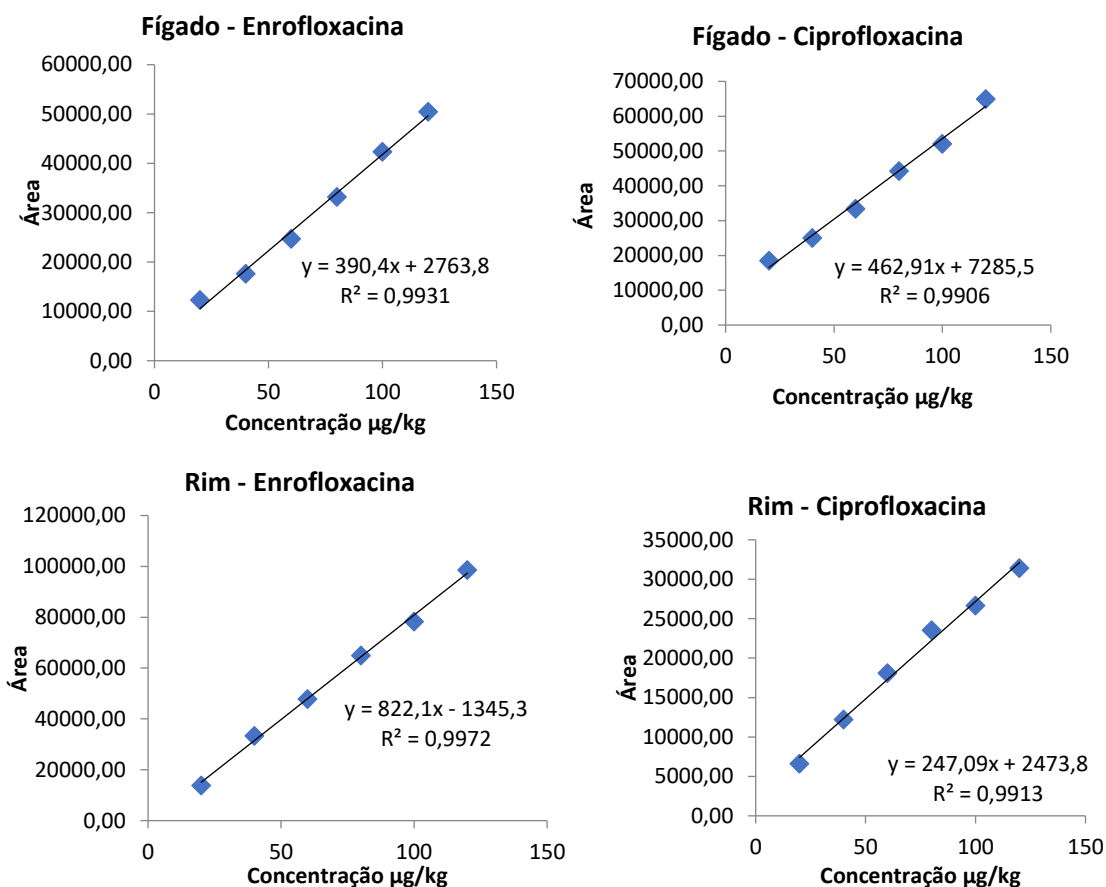
5.1 Parâmetros de validação

5.1.1 Linearidade

As equações de regressão e o coeficiente de determinação para músculo, fígado e rim mostraram linearidade adequada na faixa de 20 a 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 1). Os valores do coeficiente de determinação (R^2) obtidos estão acima de 0,99, estando em conformidade com os critérios do INMETRO que recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2011b).

Figura 1 - Linearidade para enrofloxacin e ciprofloxacina em músculo, fígado e rim.





Fonte: Autor (2020)

5.1.2 Seletividade

A seletividade foi comprovada para todos os analitos, visto que não foram observadas transcrições interferentes nos tempos de retenção para os analitos estudados (ANEXO A).

5.1.3 Precisão e exatidão

Conforme mostrado na Tabela 5 a ENR e a CIP foram extraídas satisfatoriamente nos três níveis de fortificação e para todos os tecidos estudados, com recuperação variando entre 92,47% a 100,91% para ENR e 87,33% a 98,33% para CIP. A precisão desse método também está apresentada na Tabela 4 como repetibilidade e reprodutibilidade expressa como CV (%).

Tabela 5 - Taxas de recuperação e coeficientes de variação de repetibilidade e reprodutibilidade para ENR e CIP em matrizes de fígado, músculo e rim.

Tecido	Analito	Nível de fortificação (µg/kg)	Recuperação (%)	CV Repet (%)	CV Reprod (%)
Músculo	ENR	25	95,75	7,19	7,96
		50	97,30	7,52	7,39
		75	92,47	5,66	6,50
	CIP	25	89,36	8,90	8,60
		50	94,94	9,01	9,95
		75	87,33	7,27	7,01
Fígado	ENR	25	100,91	4,90	4,52
		50	98,77	6,84	6,72
		75	93,21	8,02	9,23
	CIP	25	98,33	10,21	10,06
		50	97,53	10,26	9,49
		75	95,72	7,45	8,21
Rim	ENR	25	99,65	12,86	12,23
		50	98,06	7,29	7,33
		75	98,90	6,30	6,50
	CIP	25	92,67	11,49	11,06
		50	96,81	9,35	9,29
		75	94,98	8,13	8,13

Repet: repetibilidade – Reprod: reprodutibilidade

Fonte: Autor (2020)

A precisão do método está de acordo com os limites estabelecidos de 70-120% pelo *Codex Alimentarius* (CODEX, 2009) e de 80 – 110% pelo MAPA (BRASIL, 2011b). O valor do CV em relação à repetibilidade e reprodutibilidade ficou dentro do valor aceitável (CV <20%) para os tecidos estudados (MAPA, 2011b; CODEX, 2009).

A exatidão, avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação, é expressa como erro sistemático que ocorre pelas perdas em todas as etapas de extração da amostra obtendo baixa recuperação do analito, tais como limpeza da amostra, diluições imprecisas, substâncias interferentes na amostra, entre outros (BRASIL, 2011b). Portanto, os valores obtidos de recuperação para a metodologia empregada, demonstra que essas perdas estão de acordo com os valores estabelecidos por legislação.

O procedimento de extração com QuEChERS é um método rápido de preparo de amostras e combina a técnica de separação líquido-líquido e extração em fase sólida (ZHANG et al., 2019). Neste trabalho, utilizou-se a metodologia QuEChERS associada a acetonitrila na extração dos analitos, com excelentes resultados de linearidade e recuperação. Assim como Lucatello et al. (2015), que obteve R^2 acima de 0,99, recuperação acima de 70%, LD na faixa de 2,0 - 9,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e LQ de 12,5 – 18,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ENR e CIP em músculo, fígado e rim de peru.

Quinolonas também foram extraídas com Acetonitrila (ACN) em amostras de ovos, leite, peixe, músculo ovino e de frango e rim suíno por Stoilova et al., (2013), com recuperações entre 77% e 120%, LD e LQ entre 3 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 7,5 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Outro estudo utilizando QuEChERS e acetonitrila na extração de quinolonas em amostras de pescado, observou-se R^2 acima de 0,99, LD entre 0,1 e 4,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e recuperações entre 72% e 108% (LOMBARDO-AGÜÍ et al., 2015). Esses resultados aliados ao obtido neste estudo demonstram a eficácia na utilização de acetonitrila na extração de quinolonas em diferentes matrizes.

Os adsorventes dispersivos tem efeitos importantes na limpeza e recuperação de diferentes analitos. Um estudo realizado em peitos de frango, comparando dois dispersivos SPE (PSA e NH_2), utilizando ACN com ácido acético na extração e sulfato de sódio como agente secante, demonstrou que os adsorventes utilizados apresentaram recuperação para ENR e CIP de 71% e 38% para PSA e 68% e 37% para NH_2 , respectivamente (STUBBINGS; BIGWOOD, 2009). O *Codex Alimentarius* estabelece um limite de 70-120% na recuperação de analitos, para validação do método de extração (CODEX, 2009). Dessa forma, neste estudo foi utilizado o dispersivo contendo a combinação de C-18 e PSA, que apresentou excelentes resultados de recuperação dos analitos (> 89%). Portanto, esses adsorventes aparecem como opção na limpeza de amostras de tecidos para análise de resíduos.

5.1.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de quantificação do método foi determinado pelo primeiro nível da curva de calibração (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de cada analito e tecido estudado (BRASIL, 2011b). Os valores de recuperação para esse nível de fortificação estão mostrados na Tabela 6. Foram obtidos boa recuperação e coeficiente de variação menor que 12% para os

analitos estudados. Os valores encontrados demonstram que o método é capaz de quantificar com exatidão resíduos acima de 20 µg/kg.

O limite de detecção do método foi estimado em 10 µg/kg, como sendo a metade do LQ. Em que as relações sinal/ruído foram superiores a 3 para todos os analitos e tecidos estudados.

Na análise de resíduos de drogas, a aplicação de LC-MS/MS é recomendada devido à sua maior seletividade e sensibilidade. Valores de LQ de 12,5 µg/kg para músculo e fígado, 18,8 µg/kg para rim e LD na faixa de 2,0 - 9,8 µg/kg foram encontrados por Lucatello et al. (2015). Valores mais baixos foram encontrados em outros estudos, LQ de 2 µg/kg e LQ de 0,5 µg/kg em músculo de frango (ZHANG et al., 2018) e LQ de 9,7 µg/kg para ENR e 13,8 para CIP e LOD 4,5 µg/kg para ENR e 3,2 µg/kg para CIP em fígado de frango (MOGHADAM et al., 2016). Embora o método proposto neste trabalho tenha apresentado valores maiores de LD, o método atende os requisitos da legislação a respeito do LMR e, portanto, pode ser utilizado na quantificação de resíduos de antimicrobianos.

Os estudos mencionados calcularam o LD e LQ com base no desvio padrão das interceptações em y e a média das inclinações das curvas de calibração. Neste estudo, optou-se por determinar o LD e LQ com base no menor valor da curva de calibração, já que atende o objetivo de quantificar os resíduos de ENR e CIP nos tecidos até níveis do LMR. Os valores determinados neste estudo garantem o controle dos níveis de resíduos na carne, sendo financeiramente viável a análise em escala industrial.

5.1.5 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$, calculados a partir do desvio padrão de 20 amostras brancas fortificadas no nível de 50 µg/kg, estão descritos na Tabela 6. Os valores para $CC\alpha$ e $CC\beta$ são maiores para CIP para todos os tecidos, que pode ser explicado pelos maiores valores do coeficiente de variação para esse analito. Em contrapartida, valores de $CC\alpha$ de 57,2 µg/kg para CIP e 55,9 µg/kg para ENR e $CC\beta$ de 60,6 µg/kg para CIP e 61,8 µg/kg para ENR foram encontrados em outro estudo com amostras de músculo de frango. Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ são calculados com

base nos coeficientes de variação de cada método e por isso valores diferentes são encontrados de acordo com as individualidades de cada método.

Tabela 6 - Valores de CC α , CC β , LD, LQ e recuperação no nível de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para cada analito e tecido estudado.

Tecido	Analito	$\mu\text{g}/\text{kg}$				20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		CC α	CC β	LOD	LOQ	% Recuperação	% CV
Músculo	ENR	62,33	74,45	10	20	98,4	10,80
	CPR	64,78	81,09	10	20	96,2	11,65
Fígado	ENR	61,22	72,24	10	20	101,2	3,47
	CPR	66,83	82,39	10	20	97,8	8,91
Rim	ENR	61,96	73,98	10	20	97,7	11,04
	CPR	65,33	80,57	10	20	100,8	9,31

Fonte: Autor (2020)

O limite de decisão (CC α) e a capacidade de detecção (CC β) levam em consideração a variabilidade do método e o risco estatístico (FEDDERN et al., 2018). Por isso, os valores encontrados foram considerados satisfatório para a análise.

5.2 Depleção de ENR e CIP em tecidos de frangos de corte

Os resultados obtidos nas análises do tratamento controle demonstraram não haver resíduo dos medicamentos testados para nenhum dia de coleta, demonstrando que não houve contaminação durante o alojamento das aves, tratamentos das aves, coleta dos materiais ou extração dos tecidos.

Após a administração, a ENR é biotransformada em CIP (MORALES-GUTIÉRREZ et al., 2015). Considerando esta biotransformação, a legislação brasileira determina o LMR para a soma de ENR+CIP em frangos de corte como 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para músculo, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para fígado e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para rim (BRASIL, 2019). Para garantir carne de frango segura aos consumidores, o tempo de carência deve ser respeitado. O experimento de depleção mostrou que, após 3 dias, os valores médios de ENR + CIP foram de 48,73 e 147,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no músculo e no fígado, respectivamente, e não detectados no rim (Tabela 7, 8 e 9). Todos esses valores são aceitáveis e não excederam o LMR.

Tabela 7 - Concentrações de ENR e CIP em amostras de músculo para cada dia de coleta.

Tempo após última dose (dias)	Concentração ± DP ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		
	ENR	CIP	ENR+CIP
1	727.33 ± 84.83 ^a	98.51 ± 14.09 ^a	825.84 ± 85.40 ^a
2	192.45 ± 45.41 ^b	19.25 ± 4.46 ^b	211.7 ± 48.21 ^b
3	24.63 ± 6.53 ^c	24.1 ± 4.14 ^c	48.73 ± 8.67 ^c
4-10	nd	nd	Nd

nd: não detectado. Limite de detecção: $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$

*Médias seguidas de mesma letra, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Fonte: Autor (2020)

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados de depleção para os analitos testados em músculo. No terceiro dia após a última dose de ENR tem-se valores para a soma de ENR+CIP abaixo do LMR estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2019). Um estudo realizado por San Martin et al. (2009), em que frangos foram tratados com 10 mg/kg de diferentes formulações de ENR comercial à 10%, 20%, 80% e 16%, definiu um tempo de 4, 3, 3 e 5 dias, respectivamente, para diminuir a concentração de resíduos em músculo de frango a níveis aceitáveis determinado pela UE (100-200 $\mu\text{g/kg}$ para músculo e rim respectivamente). Esses resultados associados aos dados obtidos neste estudo demonstram a diversidade no tempo de carência para diferentes formulações do antibiótico.

São registrados no Brasil 14 produtos de ENR e os tempos de carência determinado pelo fabricante variam de 2 a 13 dias (SIDAN, 2020). Considerando o menor tempo indicado pelos fabricantes dos produtos de ENR (2 dias), foi detectado, neste estudo, uma quantidade de 211,7 $\mu\text{g/kg}$ de ENR+CIP em músculo. Considerando então que o consumo per capita de carne de frango no Brasil está em torno de 42,3 kg/hab (ABPA, 2020), no período de um ano, o consumidor poderia ingerir 8891,4 μg de resíduos destes antimicrobianos, o que poderia levar a toxicidade, reações alérgicas, e agravar a problemática de resistência.

A CIP é utilizada no tratamento humano de diversas infecções, como do trato respiratório, em casos de pneumonias causadas por *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Legionella* spp. e *Staphylococci*; infecções do ouvido médio; sinusite; olhos; rins e/ou trato urinário eferente; órgãos genitais; cavidade, pele e tecidos moles; ossos e articulações e sepse (ANVISA, 2007). O consumo excessivo

desse medicamento leva a ocorrência de resistência antimicrobiana, o que dificulta o tratamento de todas essas doenças, podendo ter um agravamento da situação do paciente.

Diante de todo esse cenário, ressalta-se a importância em determinar o tempo de carência para ENR e CIP, a fim de garantir quantidades inferiores ao LMR na carne para consumo. Além disso, é necessário o conhecimento prévio a respeito das formulações comerciais, uma vez que os dados são diferentes para cada produto.

Tabela 8 - Concentrações de ENR e CIP em amostras de fígado para cada dia de coleta.

Tempo após última dose (dias)	Concentração \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
	ENR	CIP	ENR+CIP
1	1330.31 \pm 71.77 ^a	986.63 \pm 66.49 ^a	1158.48 \pm 65.07 ^a
2	200.1 \pm 7.35 ^b	171.27 \pm 8.65 ^b	371.37 \pm 12.61 ^b
3	77.46 \pm 3.44 ^c	69.94 \pm 6.51 ^c	147.4 \pm 5.69 ^c
4	52.8 \pm 8.55 ^{cd}	43.91 \pm 8.90 ^{cd}	96.71 \pm 13.16 ^{cd}
5	35.02 \pm 9.51 ^{de}	30.51 \pm 4.95 ^{de}	65.53 \pm 12.94 ^{de}
6	12.97 \pm 2.03 ^e	18.03 \pm 2.89 ^e	31.00 \pm 3.66 ^e
7-10	nd	nd	Nd

nd: não detectado. Limite de detecção: 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

*Médias seguidas de mesma letra, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Fonte: Autor (2020)

Os resultados expostos na Tabela 8 demonstram que o fígado apresenta valores detectáveis mais longos que os outros tecidos estudados, até 6 dias após o tratamento e apresenta as maiores concentrações dos analitos. Estes dados são semelhantes aos de Kalpana et al. (2012), que administraram ENR a 10 mg/kg em frangos por via oral e analisou fígado, rim, músculo e pele mais tecido adiposo, detectando o medicamento somente em fígado até 10 dias após o tratamento. O fígado é o principal local de biotransformação de medicamentos, a fim de facilitar a excreção biliar, filtração glomerular e secreção tubular renal (LAUREN; TREPANIER, 2013). Neste caso, o fígado é determinante para análise de resíduos, já que pode transferir quantidades significativas de antibióticos ao consumidor.

No entanto, a legislação estabelece valores de LMR de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para esse tecido e no terceiro dia após a administração do medicamento essa condição é atingida. Período de tempo similar foi encontrado por Bonassa et al. (2017), que

analisou o tempo de carência para ENR+CIP em frangos tratados via gavagem com 10 mg/kg de ENR comercial a 25% e encontrou um tempo de 4-5 dias. Portanto, embora nesse estudo o tempo de 3 dias apresentou-se suficiente para reduzir a concentração de antimicrobiano a valores aceitáveis, é necessário estabelecer um tempo de segurança para não haver riscos à saúde do consumidor.

Valores de depleção para as amostras de rim estão apresentados na Tabela 9. Os dados da tabela demonstram que no segundo dia após a administração do antimicrobiano, as concentrações detectadas já estão em conformidade com o LMR (300 µg/kg), similar ao estudo de Bonassa et al. (2017) que também administraram ENR comercial na dosagem de 10 mg/kg e encontraram 3 dias de tempo de carência em amostras de rim.

Tabela 9 - Concentrações de ENR e CIP para amostras de rim para cada dia de coleta.

Tempo após última dose (dias)	Concentração ± DP (µg.kg ⁻¹)		
	ENR	CIP	ENR+CIP
1	374.71 ± 9.07 ^a	91.01 ± 1.75 ^a	465.72 ± 9.58 ^a
2	64.37 ± 2.68 ^b	19.74 ± 2.73 ^b	84.11 ± 4.48 ^b
3-10	Nd	nd	nd

nd: não detectado. Limite de detecção: 10 µg.kg⁻¹

*Médias seguidas de mesma letra, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Fonte: Autor (2020)

A maioria dos medicamentos é eliminada por uma combinação de biotransformação (principalmente no fígado) e excreção através dos rins (LANDONI; ALBARELLOS, 2015). Quando não são totalmente excretados, podem haver resíduos de antibióticos nos rins, por isso a importância em analisar este tecido.

5.3 Resistência de microrganismos à antimicrobianos

Os antibióticos administrados que não são totalmente metabolizados são liberados no meio ambiente e acabam poluindo a água, esterco ou solo. Em consequência disso há a transferência de cepas também para o ambiente e à exposição constante aos níveis desses antibióticos levam ao aumento da incidência de resistência em toda a cadeia (MANYI-LOH et al., 2018). A ENR foi detectada na

excreta de aves e no solo, representando uma fonte de poluição para o meio ambiente (LEAL et al., 2012). Para avaliar a influência do material fecal na resistência de *Salmonella* spp., amostras de fezes foram analisadas.

Um total de 123 cepas de *Salmonella* spp. foram isoladas a partir de amostras de fezes de aves. A Tabela 10 apresenta o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados e a diferença de comportamento para *Salmonella* isolada e *Salmonella* associada ao material fecal.

Tabela 10 - Sensibilidade a antimicrobianos para *Salmonella* isolada e presente no material fecal

Sensibilidade de <i>Salmonella</i> sp. a antimicrobianos %				
Antimicrobiano (mg/kg)	isolada		no material fecal	
	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível
Enrofloxacina (10)	0,0	100,0	60,2	39,8
Amoxicilina (20)	100,0	0,0	100,0	0,0

n=123

Fonte: Autor (2020)

Salmonella spp. quando isolada demonstrou sensibilidade para a ENR e resistência para amoxicilina. Porém, houve uma menor sensibilidade para a ENR quando associada ao material fecal. Somente 39,8% das cepas testadas foram sensíveis para o antimicrobiano, o que demonstra que as cepas isoladamente tendem a ser menos resistentes que a população como um todo, ou seja, os micro-organismos naturalmente resistentes podem proteger os outros da ação do antimicrobiano (BECATTINI et al., 2016).

Os resultados demonstram que *Salmonella* spp. teve comportamento diferente em contato com o material fecal. As fezes podem ter alterado as condições do experimento, devido a composição, concentração de nutrientes, pH do meio, entre outros fatores. O material fecal presente no estudo foi capaz de aumentar a capacidade de sobrevivência da *Salmonella* spp. em contato com o antimicrobiano, relacionado com a alteração da permeabilidade e transporte celular (AHN et al., 2013).

Além disso, alguns estudos têm relacionado o aumento da resistência à presença das bombas de efluxo, que são capazes de eliminar substratos nocivos às células (AUDA et al., 2020; LI et al., 2019). Assim, a redução na sensibilidade de ENR associada ao material fecal pode estar relacionada com a composição das fezes associada as bombas de efluxo presente no micro-organismo.

Alguns estudos sobre a influência da suplementação de antimicrobianos na microbiota fecal de frangos de corte demonstraram que há alterações significativas na associação microbiana do trato gastrointestinal (TGI) (COSTA et al., 2017; SINGH et al., 2013). Desta forma, a utilização de antimicrobianos pode ter interações com a microbiota presente no TGI dos frangos e diminuir a eficácia no controle da *Salmonella* spp., pois cepas resistentes suportam o estresse produzido pelo antibiótico e melhoram a sobrevivência dos constituintes menos resistentes da população, em parte pela produção de indol, uma molécula sinalizadora capaz de fornecer proteção para outras células mais vulneráveis (LEE et al., 2010).

Os antibióticos exercem uma pressão seletiva que impulsiona o desenvolvimento rápido de cepas resistentes, o que requer diversas mutações no DNA ou a transferência de genes de resistência. Os genes de resistência se espalham entre as bactérias através da conjugação, transdução e transformação e esse processo é desencadeado pela exposição a antimicrobianos (BECATTINI, 2016). O trato gastrointestinal possui uma grande variedade de micro-organismos e é provável que a utilização de antimicrobianos promova a difusão de genes de resistência na microbiota, explicando a diminuição na sensibilidade da *Salmonella* associada a microbiota.

Entre as 124 amostras de fezes coletadas, apenas uma apresentou resultado negativo para *Salmonella* spp. Portanto, foram isolados um total de 123 cepas de *Salmonella* e todas foram tipificadas como *Salmonella* Heidelberg. A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg é um sorotipo importante em infecções humanas e o terceiro sorotipo mais isolado de amostras de frango de varejo (GIERALTOWSKI et al., 2016, EDIRMANASINGHE et al., 2017).

No Brasil, a *S. Heidelberg* demonstra alta prevalência e está associada à resistência a diferentes antimicrobianos, ácido nalidíxico, tetraciclina, ampicilina, cefalotina (PANDINI et al., 2015; VOSS-RECH et al., 2015, BRASIL, 2012). O Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), que avaliou o perfil de sensibilidade de cepas de *Salmonella* spp. em carcaças de frango demonstrou a prevalência da *S. Heidelberg* no país e a resistência desse sorotipo para quatro diferentes classes de antimicrobianos, incluindo as quinolonas (BRASIL, 2010).

Estudos realizados avaliando os genes de resistência para *S. Heidelberg* exibiram uma ampla diversidade de genes relacionados a resistência e também a

capacidade de transferências horizontais desses genes (DEBLAIS et al., 2018). Portanto, a disseminação desse sorovar aliado a incidência de resistência apresentada neste trabalho demonstram a importância de uma abordagem mais aprofundada sobre esse sorovar.

A ENR e a Amoxicilina são antimicrobianos de amplo espectro de ação e utilizados no tratamento de uma grande variedade de infecções (ROCHA et al., 2011). Um relatório sobre uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte mostrou que estes antibióticos estão entre os medicamentos mais empregado no controle com função preventiva na fase de terminação em frangos de corte no Paraná (PARANÁ, 2005). Por isso, o interesse em estudar esses antimicrobianos e determinar sua eficácia contra *Salmonella* spp.

Na Tabela 11 estão os resultados para sensibilidade da *Salmonella* Heidelberg para os antimicrobianos testados. De acordo com os resultados apresentados os isolados de *Salmonella* demonstraram resistência a três antimicrobianos testados e para a ENR há uma sensibilidade intermediária, demonstrando redução na eficácia desse medicamento no controle de *S. Heidelberg*.

Tabela 11 - Perfil de sensibilidade a antimicrobianos para *Salmonella* Heidelberg isoladas em amostras de fezes de frangos.

Antimicrobianos (μg)	Número de isolados (%)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Amoxicilina (10)	0 (0,0)	0 (0,0)	123,0 (100)
Amoxicilina/Ácido Clavulânico (30)	0 (0,0)	0 (0,0)	123,0 (100)
Canamicina (10)	115 (93,5)	8 (6,5)	0 (0,0)
Gentamicina (10)	123 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Neomicina (10)	73 (59,4)	49 (39,8)	0 (0,0)
Ceftiofur (30)	0 (0,0)	1 (0,8)	122 (99,2)
Colistina (10)	123 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Enrofloxacina (5)	37 (30,1)	85 (69,1)	0 (0,0)
Norfloxacina (5)	123 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Ciprofloxacina (5)	122 (99,2)	1 (0,8)	0 (0,0)
Fosfomicina (50)	123 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Lincomicina + Espectiomicina (10)	123 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Tetraciclina (30)	0 (0,0)	0 (0,0)	123 (100,0)

n= 123

Fonte: Autor (2020)

A sensibilidade de 30,1% das amostras testadas para a Enrofloxacina é uma preocupação para a utilização desse antimicrobiano no tratamento de frangos de corte. A sensibilidade reduzida desse composto também foi relatada na China, em que foram isolados de carne de aves de varejo, com prevalência dos sorovares *S. Enteritidis*, *S. Indiana* e *S. Typhimurium* (YANG et al., 2020). A susceptibilidade reduzida (resistência intermediária) das fluoroquinolonas (Enrofloxacina), representa uma ameaça à saúde pública, já que essas classes de antimicrobianos são comumente utilizadas no tratamento de salmoneloses em humanos e animais (GIURIATTI et al., 2017).

Ainda sobre as fluoroquinolonas, a resistência à CIP está ausente no presente estudo, bem como entre os isolados de *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi A*, *S. Enteritidis* e *S. Kentucky* de carne de frango no Egito (MOAWAD et al., 2017). Em contrapartida, 64,2% dos isolados com predominância de *S. Enteritidis*, *S. Indiana* e *S. Typhimurium* na China não eram sensíveis a esse antimicrobiano (Yang et al., 2020) e também 52% dos isolados com prevalência de *S. Schwarzengrund* apresentaram resistência em estudo realizado no Brasil (PENHA FILHO et al., 2019). O resultado demonstra que esse antimicrobiano ainda é eficaz no tratamento de doenças causadas por *Salmonella* Heidelberg, porém estudos com diferentes sorovares e diferentes localizações tendem a ter outros resultados. Por isso, há a necessidade de avaliar todos os parâmetros na escolha do melhor medicamento para cada caso.

Na Tabela 12 estão apresentados os antimicrobianos que não foram eficazes no controle de *Salmonella* Heidelberg e suas respectivas classes. Os isolados de apresentaram resistência para três classes distintas de antimicrobianos (Penicilinas, Cefalosporinas e Tetraciclina). Os resultados demonstram um problema global, já que o desenvolvimento de multirresistência dificulta o tratamento de doenças ocasionadas por esse micro-organismo.

Tabela 12 – Antimicrobianos ineficientes no controle de *S. Heidelberg* e suas respectivas classes.

Classe	Antimicrobiano	Resistente (%)
Penicilinas	Amoxicilina	100
	Amoxicilina com Ácido Clavulânico	100
Cefalosporinas	Ceftiofur	99,19
Tetraciclina	Tetraciclina	100

Fonte: Autor (2020)

Os antimicrobianos da classe das penicilinas e tetraciclinas também apresentaram resistência em outros estudos realizados. Foi detectado resistência para amoxicilina em 75,3% dos isolados de *S. Albany*, *S. Schwarzengrund* e *S. Hadar* de intestino e fezes de perus em Taiwan (YEH, 2018). Um estudo realizado com amostras de *swab* de cloaca e produtos avícolas, foi encontrada resistência em 80% dos isolados de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. para Amoxicilina e 64,5% para Tetraciclina (KHAN, 2019). Em outro estudo com isolados de granjas no sudeste dos Estados Unidos foi observado que 63% das *Salmonella* spp. eram resistentes a Tetraciclina (VELASQUEZ et al., 2018). Demonstrando a elevada incidência de resistência para esses antimicrobianos em diferentes locais e também com diferentes sorovares isolados.

As cefalosporinas são os principais medicamentos para o tratamento de infecções bacterianas graves em humanos e animais (WONG et al., 2014; KIM et al., 2016). Os resultados indicam haver resistência a esse tipo de antimicrobiano o que pode representar um grande problema de saúde pública, pois indica limitações no tratamento de infecções causadas por *Salmonella* em humanos. Associado a isso, duas outras classes apresentaram os mesmos resultados, diminuindo as opções de antimicrobianos efetivos e demonstrando a necessidade de alternativas para a melhor eficácia no controle desse patógeno.

6 CONCLUSÃO

Considerando todos os parâmetros de validação analisados, o método apresentado em nosso estudo teve boa recuperação e sensibilidade, sendo aplicável à análise de rotina dos resíduos de ENR e CIP nas indústrias avícolas. A transferência de resíduos na cadeia alimentar favorece a resistência a antimicrobianos. Assim, é importante determinar o tempo de carência para os antimicrobianos. Este estudo demonstrou que 3 dias foram suficientes para diminuir a concentração dos resíduos de ENR e CIP para valores abaixo do LMR nas amostras avaliadas. A presença de material fecal mostrou influência no resultado de resistência a ENR, diminuindo a sensibilidade de *S. Heidelberg*. O surgimento e a disseminação de *Salmonella* resistente a antimicrobianos, bem como os resíduos presentes na carne para consumo e no ambiente, tem importantes implicações na saúde pública, já que o uso comum de antimicrobianos podem afetar negativamente o tratamento de doenças causadas em humanos, podendo levar a uma antibioticoterapia ineficiente e leva a complicações mais graves.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Protocolo de Bem-Estar para Frangos de Corte. 2016**. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2019/04/Protocolo-de-Bem-Estar-para-Frangos-de-Corte-2016.pdf>. Acesso em: fev. 2020.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2020**. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf. Acesso em 27 maio 2020.

AHMED, M. M.; ELMARAGHY, A. A.; ANDRAWAS, E. W. Study of prescription patterns of antibiotics in treating lower respiratory tract infections at Sohag Chest Hospital. **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**, v. 65, n. 1, p. 143-155, jan. 2016.

AHN, Y.; STUCKEY, R.; SUNG, K.; RAFII, F.; CERNIGLIA, C.E. Influence of Sterilized Human Fecal Extract on the Sensitivity of *Salmonella* enterica ATCC 13076 and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 to Enrofloxacin. **Antibiotics**, v. 2, p. 485-499, 2013.

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais: guia prático**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009.

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565-1574, fev. 2014.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRA~NAGA, M. R.; CASTELLANO, V. Regulatory aspects for the drugs and chemicals used in food-producing animals in the European Union. **Veterinary Toxicology**, Oxford, p. 135 – 155, 2012.

ANDRIOLE, V. T. The quinolones: Past, present, and future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 2, p. S113–S119, jul. 2005.

ANVISA. **Bulário Eletrônico**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp#. Acesso em: 23 jul. 2020.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 775-790, abr. 2012.

ASSIS, D. C. S. de; SILVA, G. R. de; LANZA, I. P.; RIBEIRO, A. C. dos S. R.; LANA, A. M. Q.; LARA, L. J. C.; FIGUEIREDO, T. C. de; CANÇADO, S. de. V. Evaluation of the Presence and Levels of Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Sulfaquinoxaline and Oxytetracycline in Broiler Chickens after Drug Administration. **PLOS one**, v. 11, n. 11, nov. 2016.

AUDA, I. G.; SALMAN, I. M. A.; ODAH, J. G.; Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. **Gene Reports**, v. 20, n. 1, p. 1-11, abr. 2020.

AVCI, I. Y.; KILIC, S.; ACIKEL, C. H.; UCAR, M.; HASDE, M.; EYIGUN, C. P.; PAHSA, A.; CETINER, S. Outpatient prescription of oral antibiotics in a training hospital in Turkey: Trends in the last decade. **Journal of Infection**, v. 52, n. 1, p. 9–14, jan. 2006.

AWAD, Y. M.; KIM, S. C.; EL-AZEEM, KIM, K. H.; KIM, K. R.; KIM, K.; JEON, C.; LEE, S. S.; Ok, S. Y. Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. **Environmental Earth Sciences**, v. 71, n. 3, p. 1433-1440, jan. 2014.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p.172-175, 2001.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, v. 40, n. 1, p. 1-13, fev. 2011.

BECATTINI, S.; TAUR, Y; PAMER, E. G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 458-478, jun. 2016.

BEN, Y.; FU, C.; HU, M.; LIU, L.; WONG, M. H.; ZHENG, C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. **Environmental Research**, v. 169, n. 1, p. 483-493, fev. 2019.

BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**. 2 ed. Campinas: Facta, 2009.

BEUC - Bureau Europeen des Unions de Consommateurs. European Consumer Organization. **Antibiotic use in livestock: Time to act**. Jun. 2014.

BISWAS, A. K; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A. S. R.; MANDAL, P. K. Food safety concerns of pesticides, veterinary drug residues and mycotoxins in meat and meat products. **Asian Journal of Animal Sciences**, Korea, v. 4, n. 2, p. 46-55, 2010.

BONASSA, K. P. D.; MIWA, Y. M.; SIMAS, R. C.; MONTEIRO, D. A.; EBERLIN, N.; ANADÓN, A.; REYES, F. G. R. Tissue depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in broiler chickens after oral administration of a new veterinary pharmaceutical formulation containing enrofloxacin. **Food and Chemical Toxicology**, v.105, n.1, p. 8-13, jul. 2017.

BORDA-MOLINA, D.; SEIFERT, J.; CAMARINHA-SILVA, A. Current Perspectives of the Chicken Gastrointestinal Tract and Its Microbiome. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, n.1, p. 131 – 139, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. **Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência Bacteriana em frango (PREBAF)**. Brasília, 2012.

BRASIL. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2010. Orientações sobre validação de métodos analíticos. **DOQ-CGCRE-008**. Revisão: 04, julho/2011, p.20, 2011b.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 51. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Diário Oficial da União**, 19 de dezembro de 2019.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Portaria n° 126, de 03 de novembro de 1995. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum e S. Typhimurium). **Diário Oficial da União**, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 20, de 21 de Outubro de 2016. Estabelecer o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de outubro de 2016, seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. PORTARIA Nº 171, DE 13 DE Dezembro DE 2018. Intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação. **Diário Oficial da União**, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Instrução Normativa Nº 51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dez. 2019.

CARATTOLI, A. Plasmídeos e a propagação da resistência. **International journal of medical microbiology**, n. 1, v. 303, p. 298-304, mar. 2013.

CARNEIRO, M.; FERRAZ, T.; BUENO, M.; KOCH, B. E.; FORESTI, C.; LENA, V. F.; MACHADO, J. A.; RAUBER, J. M.; KRUMMENAUER, E. C.; LAZAROTO, D. M. Antibiotic prescription in a teaching hospital: a brief assessment. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 414-417, jul./ago. 2011.

CDC. Centers for disease control and prevention. **Serotypes and the Importance of Serotyping Salmonella**. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotyping-importance.html#:~:text=More%20than%202%2C500%20serotypes%20have,account%20for%20most%20human%20infections>. Acesso em: 24 jul. 2020.

CHEN, H. M.; WANG, Y.; SU, L. H.; CHIU, C. H. Nontyphoid Salmonella infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. **Pediatrics Neonatology**, v. 54, n. 3, p. 147-152, jun. 2013.

CHUAH, L.; SYUHADA, A.S.; SUHAUMI, I. M.; HANIM, T. F.; RUSUL, G. Data on antibiogram and resistance genes harboured by Salmonella strains and their Pulsed-field gel electrophoresis clusters. **Data in Brief**, v. 17, n.1, p. 698 – 702, 2018.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. **NCCLS document M2-A8** [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS. USA, 2003.

CODEX. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. **CAC/GL 71**, 2009.

COSTELLOE, C.; METCALFE, C.; LOVERING, A.; MANT, D.; HAY, A.D. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 340, n.1, mai. 2010.

CORREIA, S.; POETA, P.; HÉBRAUD, M.; CAPELO, J. L.; IGREJAS, G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 551-559, maio 2017.

COSTA, L. S.; GARCIA, L. A. F.; BRENE, P. R. A. Panorama do setor de Frango de Corte no Brasil e a Participação da Indústria Avícola Paranaense no Complexo dado seu Alto Grau de Competitividade. **Anais do IV SINGEP**, São Paulo, 2015. Disponível em: <https://singep.org.br/4singep/resultado/209.pdf>. Acesso em: 19 maio 2018.

COSTA, M. C.; BESSEGATTO, J. A.; ALFIERI, A. A.; WEESE, J. S.; BESSEGATTO FILHO, J. A.; OBA, A. Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. **Plos One**, v.12, n. 2, p. 1-13, fev. 2017.

DEBLAIS, L.; LORENTZ, B.; SCARIA, J.; NAGARAJA, K. V.; NISAR, M.; LAUER, D.; VOSS, S.; RAJASHEKARA, G. Comparative Genomic Studies of Salmonella Heidelberg Isolated From Chicken- and Turkey-Associated Farm Environmental Samples. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1841, p. 1-11, ago. 2018.

DEL FIOL, F. de S.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I. de; BARBERATO-FILHO, S. Prescription patterns and antibiotic use in community-based infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 1, jan./fev. 2010.

DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. 1 ed. Wiley, NJ, 2006.

DOYLE, M. E. **Veterinary drug residues in processed meats** - potential health risk: A review of the scientific literature. 2006. Disponível em: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRIBrief_VetDrgRes.pdf. Acesso em: 09 maio 2018.

EBRAHIMPOUR, B.; YAMINI, Y.; REZAZADEH, M. A sensitive emulsification liquid phase microextraction coupled with on-line phase separation followed by HPLC for trace determination of sulfonamides in water samples. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 1, 2015.

EC. Council Regulation 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Union**. L 221/8, 2002.

EDIRMANASINGHE, R.; FINLEY, R.; PARMLEY, E. J.; AVERY, B. P.; CARSON C.; BEKAL, S.; GOLDING, G.; MULVEY, J. A Whole-Genome Sequencing Approach to Study Cefoxitin-Resistant Salmonella enterica Serovar Heidelberg Isolates from various Sources. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1-13, abr. 2017.

EMMERSON, A. M.; JONES, A. M. The quinolones: Decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 51, n.1, p. 13–20, mai. 2003.

EU. Council Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009, on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**. L 15/1, 2010.

FEDDERN, V.; AROEIRA, C. N.; MOLOGNONI, L.; GRESSLER, V.; DAGUER, H.; COSTA, O. A. D.; CASTILLO, C. J.; LIMA, G. J. M. M. de. Ractopamine analysis in pig kidney, liver and lungs: A validation of the method scope extension using QuEChERS as a sample preparation step. **Journal of Chromatography B**, v. 1091, n. 1, p. 79-86, ago. 2018.

FERRARI, R.; GALIANA, A.; CREMADES, R.; JUAN CARLOS RODRÍGUEZ, J. C.; MAGNANI, M.; TOGNIM, M. C. B., OLIVEIRA, T. C. R. M.; ROYO, G. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 657-662, 2013.

FERRARI, S. P. G.; BONASSA, K. P. D.; COELHO, M. B.; FERREIRA, C. R.; COSTA, H. F.; JARA, J. L. P.; MIGUEL, M. C. V.; REYES, F. G. R.; EBERLIN, M. N.; NOGUEIRA, G. P.; SIMAS, R. C. High precision and selectivity for quantitation of enrofloxacin and ciprofloxacin in five chicken tissues using solid phase extraction and ESI LC-MS/MS for application in monitoring residues. **Analytical Methods**, v. 7, n.1, p. 3291-3297, mar. 2015.

FIORAMONTI, C. M.; CAVALHEIRO, E. T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico. **Revista Química e Sociedade**, v. 34, n. 3, p. 118-123, mai. 2012.

FURTULA, V.; JACKSON, C. R.; FARRELL, E. G.; BARRETT, J. B.; HIOTT, L. M.; CHAMBERS, P. A. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. Isolated from Environmental Samples in an Area of Intensive Poultry Production. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 3, p. 1020 -1036, 2013.

GIERALTOWSKI, L.; HIGA, J.; PERALTA, V.; GREEN, A.; SCHWENSOHN, C.; ROSEN, H.; LIBBY, T.; KISSLER, B.; MARSDEN-HAUG, N.; BOOTH, H.; KIMURA, A. National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1-13, set. 2016.

GIURIATTI, J.; STEFANI L. M.; BRISOLA, M. C.; CRECENCIO, R. B.; BITNER, D. S.; FARIA, G. A. *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum β -lactamases (ESBLs). **Microbial Pathogenesis**, v. 109, n. 1, p. 195-199, mai. 2017.

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

GONZÁLEZ, O.; BLANCO, M. E.; IRIARTE, G.; BARTOLOMÉ, L.; MAGUREGUI, M. I.; ALONSO, R. M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, n. 1, p. 10-27, ago. 2014.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GOUVÊA, R.; SANTOS, F. dos; AQUINO, M. H. C. de; PEREIRA, V. L. A de. Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 1–10, jan./mar. 2015.

HASHIMOTO, H.; SAITO, M.; SATO, J.; GODA, K.; MITSUTAKE, N.; KITSUREGAWA, M.; NAGAI, R.; HATAKEYAMA, S. Indications and classes of outpatient antibiotic prescriptions in Japan: A descriptive study using the national database of electronic health insurance claims, 2012–2015. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 91, n. 1, p. 1–8, fev. 2020.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Mecanismos de resistência a drogas: resistência à quinolona. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1 p.12-31, 2015.

JASP Team (2020). JASP (Version 0.13)[Computer software].

JIA, S.; ZHANG, X.; MIAO, Y.; ZHAO, Y.; YE, L.; LI, B.; ZHANG, T. Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water, **Water Research**, v. 124, n. 1, p. 259-268, nov. 2017.

KALPANA, E.; AGGARWAL, M.; RAO, S. G.; MALIK, J. K. Effects of aflatoxin B1 on tissue residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in broiler chickens. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 121-126, mar. 2012.

KHAN, S. B.; KHAN, M. A.; AHMAD, I.; UR REHMAN, T.; ULLAH S.; DAD, R.; SULTAN A.; MEMON A. M. Phenotypic, genotypic antimicrobial resistance and pathogenicity of *Salmonella enterica* serovars Typimurium and Enteritidis in poultry and poultry products. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, n. 1, p. 118-124, Abr. 2019.

KIM, J. S.; YUN, Y. S.; KIM, S. J., JEON, S. E.; LEE, D. Y., CHUNG, G. T., YOO, C. K., KIM, J. Rapid emergence and clonal dissemination of CTX-M-15-producing *Salmonella enterica* serotype Virchow, South Korea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 68-70, jan. 2016.

KIM, M. S.; LIM, T. H.; JANG, J. H.; LEE, D. H.; KIM, B. Y.; KWON, J. H.; CHOI, S. W.; NOH, J. Y.; HONG, Y. H.; LEE, S. B.; YANG, S. Y.; LEE, H. J.; LEE, J. B.; PARK, S. Y. CHOI, I. S. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella species isolated from chicken meats produced by different integrated broiler operations in Korea. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2370–2375, 2012.

KOLE, P. L.; VENKATESH, G.; KOTTECHA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical chromatography**, v. 25, n. 1, p. 199 - 217, jan. 2011.

KUMAR, S.; VARELA, M. F. Molecular Mechanisms of bacterial Resistance to antimicrobial Agents. Microbial Pathogens and strategies for Combating Them: Science, technology and education. **Formatex**, p. 522- 534, 2013.

KUO, S.; SHIH, S.; LAUDERDALE, T. Y.; CHANG, I.; CHEN, Y.; HSIUNG, C. A.; CHANG, S. Policy-driven revolution of prescription record in outpatient use of fluoroquinolones. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 53, n. 1, p. 133-140, fev. 2020.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v.5, n.1, p.27-46, 2013.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, n.1, p. 35-61, 2009.

LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 21-27, jul. 2015.

LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The Veterinary Journal**, v. 205, n.1, p. 21-27, jul. 2015.

LAUREN, A.; TREPANIER, D. V. M. Applying Pharmacokinetics to Veterinary Clinical Practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 43, n. 5, p. 1013-1026, set. 2013.

LEAL R. M.; FIGUEIRA, R. F.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 432, p. 344-349, ago. 2012.

LEE H. H.; MOLLA, M. L.; CANTOR C. R.; COLLINS J. J. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. **Nature**, v. 467, n. 1, p. 82-86, set. 2010.

LEE, G. C.; REVELES K. R.; ATTRIDGE, R. T.; LAWSON, K. A.; MANSI, I. A.; LEWIS, J. S. Outpatient antibiotic prescribing in the United States: 2000 to 2010. **BMC Medicine**, Londres, v. 12, n. 1, p. 96, jun. 2014.

LI, J.; ZHANG, H.; NING, J.; SAJID, A.; CHENG, G.; YUAN, Z.; HAO, H. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 44, p. 1-13, fev. 2019.

LIN, J. Antimicrobial growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 33, p. 1-4, fev. 2014.

LOMBARDO-AGÜÍ, M.; GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; CRUCES-BLANCO, C.; GÁMIZ-GRACIA, L. Determination of quinolones in fish by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection using QuEChERS as sample treatment. **Food Control**, v. 50, n. 1, p. 864-868, abr. 2015.

LOPES, R. P.; AUGUSTI, D. V.; SANTOS, F. A.; VARGAS, E. A.; AUGUSTI, R. Development and validation of an efficient and innovative method for the quantification of multiclass veterinary drugs in milk by using LC-MS/MS analysis. **Analytical Methods**, v. 5, n.19, p. 5121-5127, 2013.

LUCATELLO, L.; CAGNARDI, P.; CAPOLONGO, F.; FERRAARESI, C.; BERNARDI, F.; MONTESISSA, C. Development and validation of an LC-MS/MS/MS method for the quantification of fluoroquinolones in several matrices from treated turkeys. **Food Control**, v. 48, n. 1, p. 2-11, fev. 2015.

LUO, Y.; YI, W.; YAO, Y.; ZHU, N.; QIN, P. Characteristic diversity and antimicrobial resistance of Salmonella from gastroenteritis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n.4, p. 251-255, abr. 2018.

LUO, Y.; YI, W.; YAO, Y.; ZHU, N.; QIN, P. Characteristic diversity and antimicrobial resistance of Salmonella from gastroenteritis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n.4, p. 251-255, abr. 2018.

MANYI-LOH, C.; MAMPHWELI, S.; MEYER, E.; OKOH, A. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. **Molecules**, v.23, n.4, p. 795- 843, mar. 2018.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.

MATTOS. K. P. H.; VISACRI. M. B.; QUINTANILHA J. C. F.; LLORET, G. R.; CURSINO, M. A.; LEVIN, A. S.; LEVY, C. E.; MORIEL, P. Brazil's resolutions to regulate the sale of antibiotics: Impact on consumption and Escherichia coli resistance rates. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, n. 1, p. 195-199, set. 2017.

MCGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, v. 45, p. 622-628, 2017.

MENKEM, Z. E.; NGANGOM, B. L.; TAMUNJOH, S. S. A.; BOYOM, F. F. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, v. 5, p. 411-415, out. 2019.

MITSCHER, L. A. Bacterial topoisomerase inhibitors: Quinolone and pyridone antibacterial agents. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 559– 592, jan. 2005.

MOAWAD A. A.; HOTZEL, H.; AWAD, O; TOMASO H.; NEUBAUER, H.; HAFEZ, H. M.; EL-ADAWY, H. Occurrence of Salmonella enterica and Escherichia coli in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 57, p. 1-13 out. 2017.

MOGHADAM, N. R.; AREFHOSSEINI, S. R.; JAVADI, A.; LOTFIPUR, F.; ANSARIN, M.; TAMIZI, E.; NEMATI, M. Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin Residues in Five Different Kinds of Chicken Tissues by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled with HPLC. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4, p. 1182-1190, dez. 2016.

MORALES-GUTIERREZ, F. J.; BARBOSA, J.; BARRON, D. Metabolic study of enrofloxacin and metabolic profile modifications in broiler chicken tissues after drug administration. **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 30-39, abr. 2015.

NADI, Z. R.; SALEHI, T. Z.; TAMAI, I. A.; FOROUSHANI, A. R.; SILANPAA, M.; SALLAL, M. M. S. Evaluation of antibiotic resistance and prevalence of common *Salmonella enterica* serovars isolated from foodborne outbreaks. **Microchemical Journal**, v. 155, n. 1, p. 1-7 June 2020.

PANDINI, J. A.; SILVA, PINTO, F.G. DA S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. sorotipos isolados de granjas de aves no Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n.1, p. 1-6, out. 2014.

PANZENHAGEN, P. H.; AGUIAR, W. S.; GOUVÊA, R.; OLIVEIRA, A. M. G. de; BARRETO, F.; PEREIRA, V. L. A.; AQUINO, M. H. Investigation of enrofloxacin residues in broiler tissues using ELISA and LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, n. 4, p. 639-653, mar. 2016.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Levantamento do uso e comercialização de 418 medicamentos veterinários em frango de corte.**

Disponível em: <http://>

http://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-42004/relatorio_levantamento_frango.pdf . Acesso em Jun. 2020.

PARRY, C. M.; THRELFALL, E. J. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 5, n. 21, p. 531-538, out. 2008.

PENHA FILHO, R. A. C.; FERREIRA, J. C.; KANASHIRO, A. M. I.; BERCHIERI JUNIOR, A.; DARINI, A. L. DE C. Emergent multidrug-resistant nontyphoidal *Salmonella* serovars isolated from poultry in Brazil coharboring blaCTX-M-2 and qnrB or blaCMY-2 in large plasmids. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 1, p. 93-98, abr. 2019.

PÉREZ-BURGOS, R.; GRZELAK, E. M.; GOKCE, G.; SAURINA, J.; BARBOSA, J.; BARRÓN, D. Quechers methodologies as an alternative to solid phase extraction (SPE) for the determination and characterization of residues of cephalosporins in beef muscle using LC-MS/MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v. 899, n.1, p. 57-65, 2012.

PINTO, T.; RAMALHINHO, I. **The consumption of quinolones in Portugal, 2005–2014.** *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, v. 66, n. 5, p. S429, jul. 2018.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. Food safety - Salmonella update in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, n. 1, p. 53-58, abr. 2019.

QU, A.; BRULC, J. M.; WILSON, M. K.; LAW, B. F.; THEORET, J. R.; JOENS, L. A.; KONKEL, M. E.; ANGLY, F.; DINSDALE, E. A.; EDWARDS, R. A.; NELSON, K. E.; WHITE, B. A. Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. 29-45, ago. 2008.

RAMATLA, T.; NGOMA, L.; ADETUNJI, M.; MWANZA, M. Evaluation of Antibiotic Residues in Raw Meat Using Different Analytical Methods. **Antibiotics**, Basel, v.6, n.4, p.34, dez. 2017.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A. de; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; MAIA, E. C. P. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

SAHU, R.; SAXENA, P.; Antibiotics in Chicken Meat. **Centre for Science and Environment**, New Delhi, India, 2014. Report n° PML/PR-48/2014.

SAN MARTIN, B.; CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; PÉREZ, F.; HIDALGO, H.; ANDRE, F. Withdrawal time of four pharmaceutical formulations of enrofloxacin in poultry according to different maximum residues limits. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 3, p. 246–251, jun. 2009.

SERGEANT, M. J.; CONSTANTINIDOU, C.; COGAN, T. A.; BEDFORD, M. R.; PENN, C. W.; PALLE, M. J. Extensive Microbial and Functional Diversity within the Chicken Cecal Microbiome. **PLOS one**, v. 9, n. 3, mar. 2014.

SINDAN Sindicato Nacional da Industria de Produtos para Saude Animal. **Compendio de 429 produtos veterinarios**. Available from 430 <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/prodpesquisa.aspx?codigo=196>. Accessed on: jul. 03 2020.

SINDIVIAPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. **Exportação frango 2017**. Disponível em:

<https://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=8&acao=detalhe&cod=177308>.
Acesso em: 11 jun. 2018.

SINGER, R. S.; FINCH, R.; WEGENER, H. C.; BYWATER, R.; WALTERS, J.; LIPSITICH, M. Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 3, n. 1, p. 47-51, 2003.

SINGH R.; YADAV, A. S.; TRIPATHI, V.; SINGH, R. P. Antimicrobial resistance profile of Salmonella present in poultry and poultry environment in north India. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 545-548, out. 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Bookman: Porto Alegre, 2002.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. **Chromatographia**, v.55, n.1, p.95-99, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3 ed. Wiley, 2009.

SOUZA, G. B. de; ROBERTO SOBRINHO, M.; BOZA, Y. Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em análise centesimal. **Comitê Técnico de Química de Alimentos da REMESP**. 1ª ed. – São Paulo: REMESP, 2016, 123 p.

SOUZA, M. V. N. New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics. **Minireviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 11, p.1019-1017, 2005.

STEIN, G. E. The 4-quinolone antibiotics: Past, present, and future. **Pharmacotherapy**, v. 8, n. 6, p. 301–314, nov./dez. 1988.

STOILOVA, N. A.; SURLEVA, A. R.; STOEV, G. Simultaneous determination of nine quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Anal Methods**, v. 6, n. 3, p. 803-813, jun. 2013.

STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p. 68-78, abr. 2009.

SUTHERLAND, R.; CROYDON, E. A. P; ROLINSON, G. N. Amoxycillin: A new Semi-synthetic Penicillin. **British Medical Journal**, v. 3, n. 1, p. 13-16, 1972.

SZABO, R.; BÖRÖCZ, K. Antimicrobial use in Hungarian long-term care facilities: High proportion of quinolone antibacterials. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 59, n. 1, p. 190–193, jul./ago. 2014.

TEIXEIRA, J. C. **Fisiologia digestiva dos animais ruminantes**. Lavras: UFLA/FAEPE. 270 p. 1996.

JFCRF. THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. MHW Notification, No. 370, 1959, amendment n. 499 2017. **The Japanese Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods**. Mai. 2006. Disponível em: <https://www.ffcr.or.jp/en/zanryu/the-japanese-positive/the-japanese-positive-list-system-for-agricultural-chemical-residues-in-foods-enforcement-on-may-29-.html>. Acesso em jun de 2020.

TONG, P.; CHEN, L.; LIU, J.; XU, L.; ZHU, L.; ZHOU, W.; LIU, G.; WANG, S.; GUO, X.; FENG, S.; SUN, Y. Metagenome analysis of antibiotic resistance genes in fecal microbiota of chickens. **Agri Gene**, v. 5, n.1, p. 1-6, set. 2017.

UMBER, J. K.; BENDER, J. B. Pets and antimicrobial resistance. **Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 39, n. 2, p. 279-292, 2009.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2^a ed. Cornell University Press. Ithaca. 476 p. 1994.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227-36, 2001.

VELASQUEZ, C. G.; MACKLIN, K. S.; KUMAR, S.; BAILEY, M.; EBNER, P. E.; OLIVER, H. F.; MARTIN-GONZALEZ, F. S.; SINGH, M. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella isolated from poultry farms in southeastern United States. **Poultry Science**, v. 97, n. 6, p. 2144-2152, Jun. 2018.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J. A.; RODRIGUES, D. P.; VOLTAR, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433 – 441, jan. 2015.

WAGMAN, A. S.; CIRZ, R.; MCENROE, G.; AGGEN, J.; LINSELL, M. S.; GOLDBLUM, A. A.; LOPEZ, S.; GOMEZ, M.; MILLER, G.; SIMONS, L. J.; BELLIOTTI, T. R.; HARRIS, C. R.; POEL, T.; MELNICK, M. J.; GASTON, R. D.; MOSER, H. E. Synthesis and microbiological evaluation of novel tetracyclic fluoroquinolones. **ChemMedChem**, USA 12, v. 12, n. 20, p. 1687-1692, set. 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance**. Fact Sheet (2014). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acesso em: 10 mai. 2018.

WHO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). **Salmonella and campylobacter in chicken meat**. Microbiological risk assessment. series 19, meeting report, 2009.

WHO. **Resistência antimicrobiana**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: jul. 2020.

WHO. **WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals**. 2017. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/cia_guidelines/en/. Acesso em: 24 jul. 2020.

WONG, M. H.; YAN M.; CHAN E. W.; BIAO, K.; CHEN, S. Emergence of clinical *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates with concurrent resistance to ciprofloxacin, ceftriaxone, and azithromycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3752-3756, Abr. 2014.

YANG X.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; LIU, S.; CHEN, L.; XIAO, C.; ZENG, H.; WEI, X.; GU, Q.; LI, Y.; WANG, J.; DING, Y.; ZHANG, J.; WU, Q. Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. **Science of the Total Environment**, v. 713, n. 1, p. 1- 9, jan. 2020.

YANG X.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; LIU, S.; CHEN, L.; XIAO, C.; ZENG, H.; WEI, X.; GU, Q.; LI, Y.; WANG, J.; DING, Y.; ZHANG, J.; WU, Q. Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. **Science of the Total Environment**, v. 713, n. 1, p. 1- 9, jan. 2020.

YEH, J. C.; CHEN, C. L.; CHIOU, C. S.; LO, D. Y.; CHENG, J. C.; KUO, H. C. Comparison of prevalence, phenotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from turkeys in Taiwan. **Poultry Science**, v. 97, n. 1, p. 279–288, jan. 2018.

ZHANG, C.; DENG, Y.; ZHENG, Y.; YANG, L.; LIAO, C.; SU, L.; ZHOU, Y.; GONG, D.; CHEN, L.; LUO, A. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 517-537, jun. 2019.

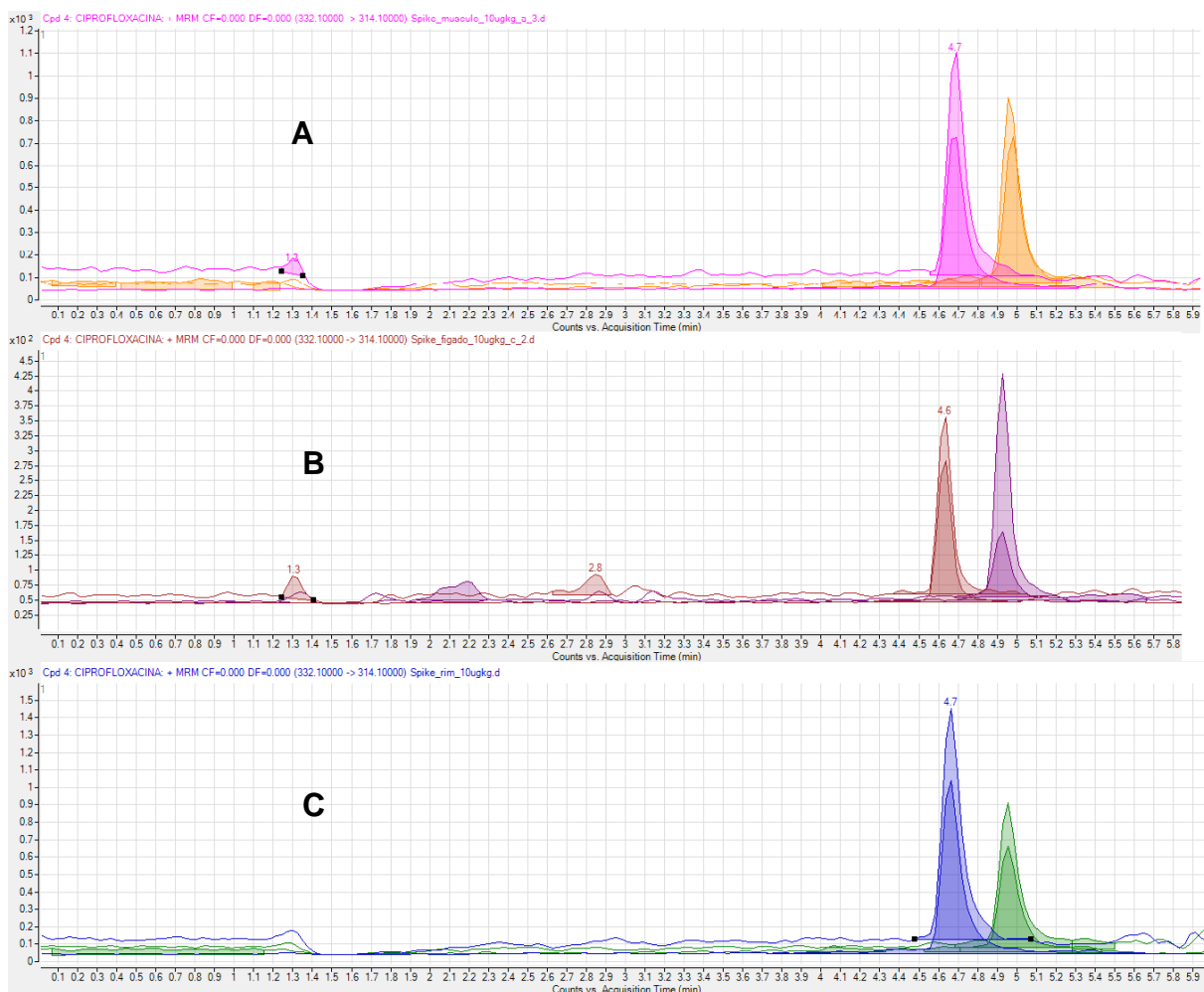
ZHANG, G. F.; ZHANG, S.; PAN, B.; LIU, X.; Feng, L. S. Derivados de 4-quinolona e suas atividades contra patógenos gram-positivos. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 710-723, 2018.

ZHANG, H. T.; JIANG, J. Q.; WANG, Z. L.; CHANG, X. Y.; LIU, X. Y.; WANG, S. H.; ZHAO, K.; CHEN, J. S. Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.12, n. 11, p. 884-891, nov. 2011.

ZOU, W.; WANG, Y.; LIN, J. Functional Cloning and Characterization of Antibiotic Resistance Genes from the Chicken Gut Microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 3028 –3032, mar. 2012.

ANEXO A – Figura demonstrando as transcrições para ENR e CIP em músculo, fígado e rim.

Figura 2 - Cromatograma para ENR e CIP em músculo, fígado e rim.



Legenda: A – Cromatograma de ENR e CIP em músculo; B – Cromatograma de ENR e CIP em fígado; C – cromatograma de ENR e CIP em rins. Tempo de retenção de 4,7 para CIP e 5 para ENR.