

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### IMUNOENSAIOS E ZOOTECNIA: APLICAÇÕES PRÁTICAS<sup>1</sup>

KEILA MARIA RONCATO DUARTE<sup>2</sup>, JONAS AUGUSTO RIZZATO PASCHOAL<sup>3</sup>, LUIZ HUMBERTO GOMES<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 05/04/06. Aceito para publicação em 21/06/06.

<sup>2</sup>CPDGRA, Instituto de Zootecnia, APTA, SAA do Estado de São Paulo, Rua Heitor Pentead, 56, Centro, Caixa postal 60, 13460-000, Nova Odessa, SP. E-mail: [keila@iz.sp.gov.br](mailto:keila@iz.sp.gov.br)

<sup>3</sup>Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNICAMP, Bloco D205, Caixa postal 6154, CEP 13084-862, Campinas, SP.

<sup>4</sup>Departamento de Genética, ESALQ, USP, Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, SP.

**RESUMO:** Durante décadas, técnicas imunológicas têm sido aperfeiçoadas no sentido de contribuir para o desenvolvimento da pesquisa, principalmente na forma de diagnóstico de doenças e na produção de vacinas. Os imunoenaios apresentam hoje um grande número de tecnologias e métodos, baseados na reação antígeno-anticorpo, que vão desde ensaios de aglutinação até uso de biosensores. Esta revisão traz de forma resumida as diversas aplicações dos imunoenaios na exploração zootécnica. Exemplos de aplicação comercial destes imunoenaios podem ser visualizados nas diferentes áreas de atuação do profissional da área de zootecnia, seja animal ou vegetal e estão expostos neste trabalho de forma a disponibilizar novas possibilidades de aplicação na agropecuária.

**Palavras-chave:** Anticorpos, ELISA, exploração zootécnica, pastagens, produção animal.

#### *IMMUNOASSAYS AND ZOOTECNY: PRACTICAL APPROACHES*

**ABSTRACT:** For decades, immunoassays have been improved and nowadays its technology offers a wide variety of methodologies, based upon antigen-antibody system, from latex agglutination to Biosensors. This revision brings up in a short term, different applications for immunoassays in zootechny exploitation. Examples of immunoassays use in different situations, as vegetal or animal areas are exposed in this work, opening new possibilities to research in agriculture, pastures and livestock.

**Key words:** Antibodies, ELISA, zootechny exploitation, pastures, animal production.

#### INTRODUÇÃO

Desde que haja uma proteína, é possível fazer um anticorpo que a reconheça e, com isso o uso de imunoenaios, baseados na reação antígeno-anticorpo têm se estendido às mais diversas áreas da Ciência, seja na saúde humana, no diagnóstico de doenças animais, fitopatógenos ou na área de xenobióticos, etc. Hoje, graças a técnicas de

bioconjugação (HERMANSON, 1996), é possível “transformar” qualquer substância ou molécula em “proteína” ou em imunógeno e assim estimular a produção de anticorpos específicos. Esse grande avanço pode ser observado na quantidade de empresas que hoje oferecem Kits baseados em imunoenaios no mercado. Tais kits, sejam na forma de colunas de imunoafinidade, placas de poliestireno ou “strips”, por exemplo, oferecem ao produtor, à la-

boratórios e a pesquisadores uma ferramenta rápida, altamente sensível a preços muito baixos comparados a outras tecnologias de detecção empregadas.

Na área de zootecnia, os imunoenaios podem contribuir, no setor animal, para diagnóstico de doenças, quantificação de proteínas específicas, como calpastatina, leptina caseína entre outras; marcadores de melhoramento genético, marcadores para qualidade de carne, adulterações em produtos de origem animal, detecção de mutações, quantificação de hormônios e detecção de contaminantes e substâncias de uso proibido, como anabolizantes, agrotóxicos, antibióticos, etc. Na área vegetal, há kits disponíveis para a quase totalidade das doenças que afetam as forrageiras e leguminosas, entre outras e uma aplicação cada vez mais crescente no mercado de detecção de transgênicos, onde o sistema imunoenzimático é capaz de verificar a expressão do gene introduzido de forma bastante precoce, antes de ensaios de campo. Outras áreas de aplicação são para averiguar a qualidade de rações, com detecção de todo tipo de contaminante ( Aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas por exemplo) e quantificação de aditivos, qualidade da água e solo (resíduos de agroquímicos na cadeia de produção).

Desta forma, esta revisão pretende mostrar alguns exemplos em cada área de aplicação, para os imunoenaios disponíveis bem como novas possibilidades, apropriadas à produção animal.

## HISTÓRICO DOS IMUNOENSAIOS

A palavra imunoenensaio significa ensaio baseado na reação antígeno-anticorpo (Ag/ Ac) que é a base da imunologia e produção de vacinas. Baseado nesta premícia, diversos imunoenaios foram desenvolvidos, principalmente no século 20. As primeiras constatações da reação Ag/ Ac vieram com o início da Imunologia, com os experimentos de Jenner (1749 - 1823), na tentativa de provar a existência de anticorpos e com isso a produção de vacinas, que só veio um século depois com PASTEUR (1880) desenvolvendo a vacina anti-rábica, vacina para cólera aviária e carbúnculo.

Em 1954 saiu o primeiro artigo sobre imunoenaios para quantificação de insulina, usando o radioimunensaio (RIA - ensaio

imunoenzimático onde o conjugado é marcado com um radioisótopo)) e em 1962, foi publicado o primeiro artigo sobre imunoenaios enzimáticos (ELISA - "enzyme linked immunosorbent assay") (Figuras 1 e 2), que substituíram o radioisótopo por uma enzima, tornando os ensaios mais baratos e mais fáceis de manusear, uma vez que trabalhar com radioisótopos é caro e há o problema da meia-vida dos elementos (LUENGO, 2005).

Em 1975, KOHLER e MILSTEIN (1975) desenvolveram a técnica de anticorpos monoclonais, que revolucionou a imunologia e a medicina, tornando possível selecionar anticorpos altamente específicos e cultivá-los em meio sintético, tornando as células produtoras praticamente imortais. A partir deste momento, os anticorpos utilizados em diferentes imunoenaios podem ser monoclonais ou policlonais (Figura 3).

Os imunoenaios mais utilizados hoje são: ELISA, baseado na marcação com enzimas; o RIA, com radioisótopos como marcação; Western Blot (Figura 4), que se baseia na localização da proteína (antígeno) por anticorpos após corrida em gel de eletroforese e transferência para membrana; Imunofluorescência (Figura 5), com uso de marcadores fluorescentes para os anticorpos, os "strips" (Figura 6) e, a imunolocalização *in situ*, que permite estudos de desenvolvimento celular e tecidual, por exemplo, capazes de sinalizar, *in situ* o aparecimento das proteínas na morfogênese vegetal ou animal.

Os biosensores hoje constituem o que há de mais moderno e aplicado na área de imunoenaios. São equipamentos capazes de realizarem a reação antígeno-anticorpo em tempo real, ou seja, em questão de minutos, utilizando quantidades mínimas de amostra e anticorpo (cerca de 3 ml cada), totalmente automatizados, geram gráficos semelhantes a cromatogramas, capazes de "trabalhar" 24 horas e analisarem um número imenso de amostras por unidade de tempo. Obviamente, esta tecnologia ainda possui um custo elevadíssimo porém abre horizontes muito mais amplos de aplicação dos imunoenaios ([www.dardni.gov.uk](http://www.dardni.gov.uk)).

## APLICAÇÃO NA ÁREA VEGETAL

Resumidamente, na área vegetal, diretamente ligada à Zootecnia, os imunoenaios contribuem na

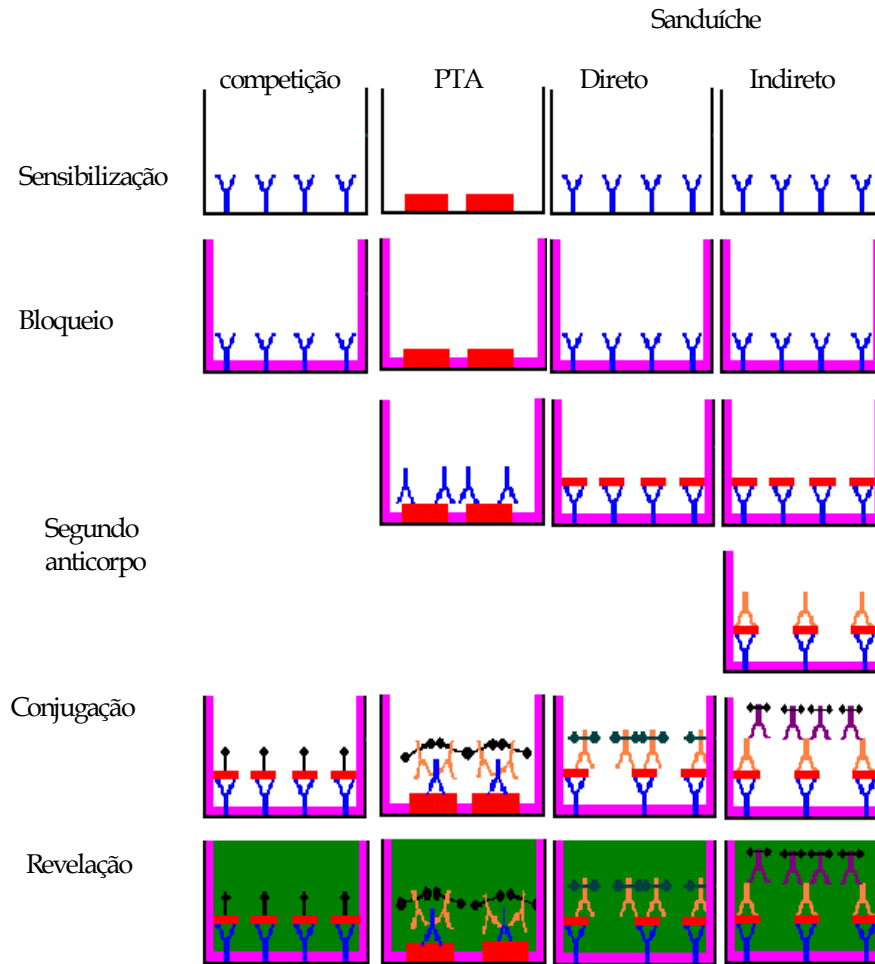


Figura 1. Tipos de ELISA esquematizados. Da esquerda para direita, ELISA de competição, PTA (Plate trapped Antigen), Sanduíche direto e indireto, mostrando na vertical os principais passos do ELISA - sensibilização, bloqueio, segundo anticorpo. Substância marcada (conjugação com a enzima) e revelação

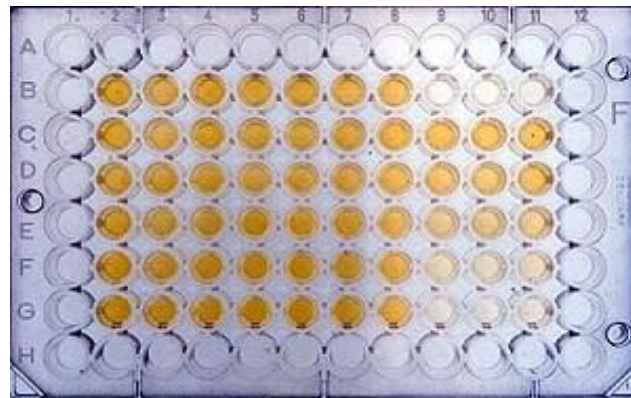


Figura 2 - Placa de poliestireno, com reação de ELISA, utilizando peroxidase como sistema enzimático

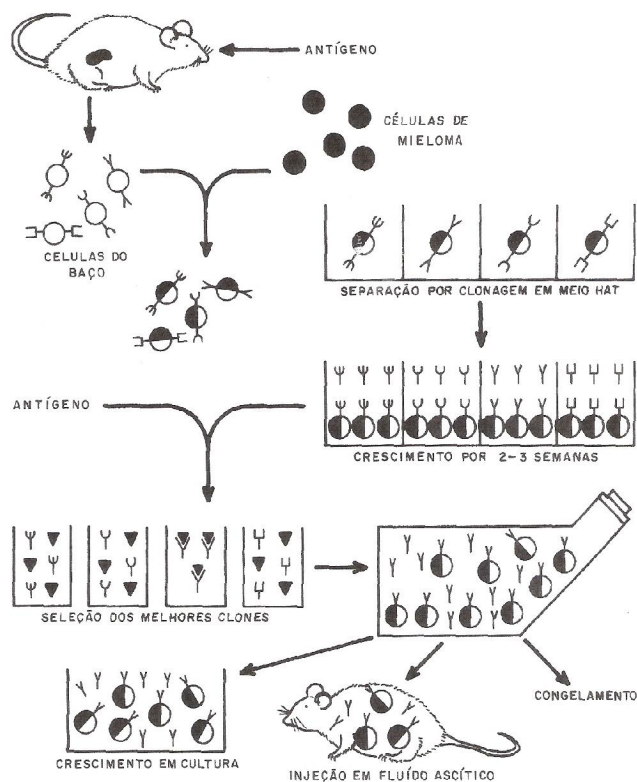


Figura 3. Esquema de produção de anticorpos monoclonais, mostrando imunização de camundongos; fusão com células de mieloma; seleção em meio HAT; crescimento e teste com antígeno; clonagem e armazenamento e; crescimento em meio sintético ou via ascite (Duarte, 1996)

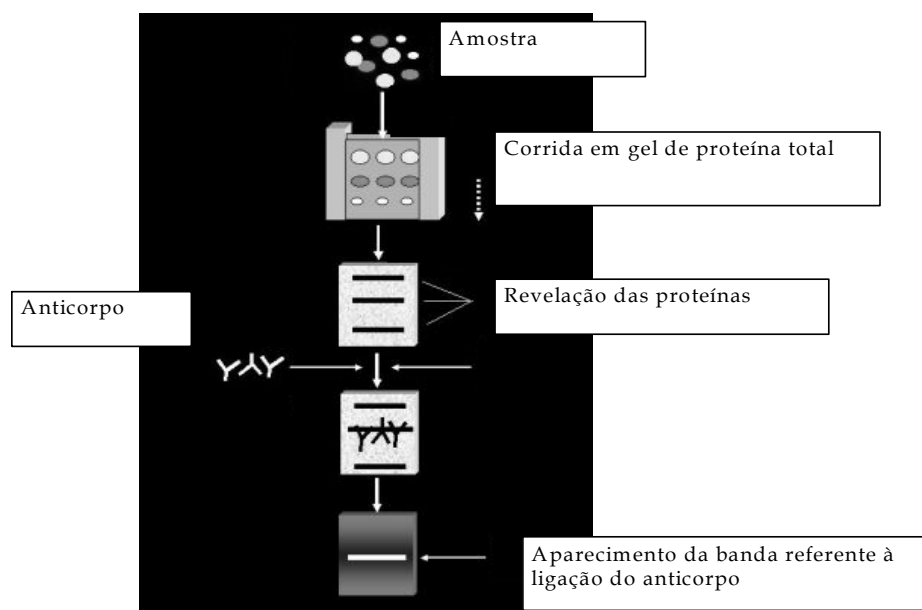


Figura 4. Esquema de funcionamento de um Immunoblotting ou Western Blotting

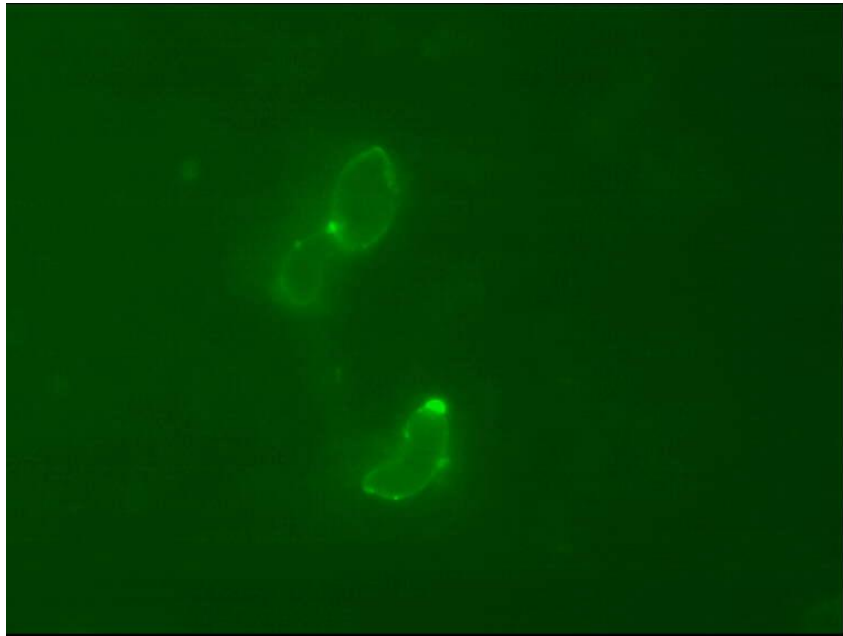


Figura 5. Imunolocalização - Imunofluorescência de esporos de *Crinipellis perniciosus*, com anticorpos específicos para estruturas da parede celular Duarte et al., 2005

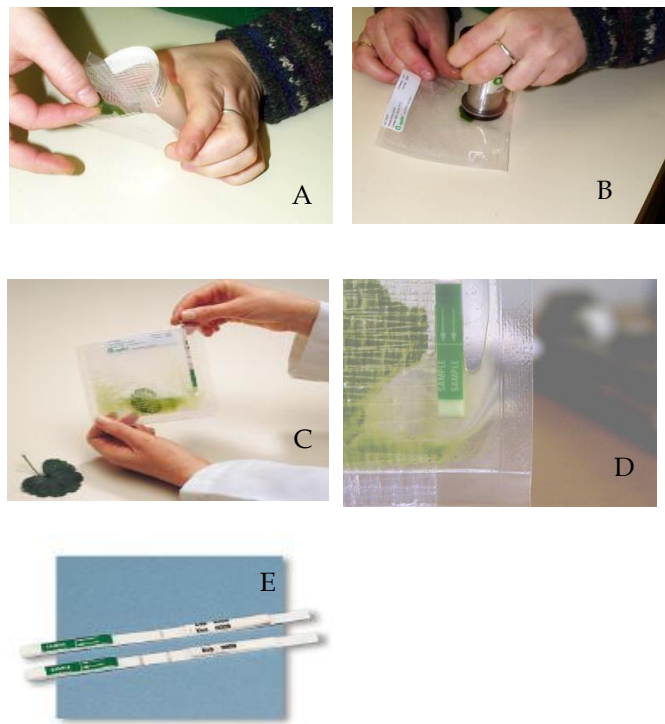


Figura 6. Esquema de um teste tipo "strip", com as fases A- amostra; B - maceração; C e D - colocação do "strip"; e, E - leitura - positivo ou negativo (Fonte: [www.agdia.com](http://www.agdia.com))

detecção de fitopatógenos em forrageiras e leguminosas e na determinação de produtos transgênicos, identificando proteínas inseridas no genoma de plantas de interesse zootécnico.

### Detecção de Fitopatógenos

Na área vegetal, o uso de imunoenaios é bastante difundido, principalmente no diagnóstico de doenças. Há mais de 30 anos, empresas se especializam na comercialização de kits de diagnóstico das mais diversas doenças, geralmente baseados em ELISA e mais recentemente “strips”, testes semelhante ao papel indicador de pH, onde a reação ocorre imediatamente após o contato do papel (“strip”) com a solução da planta a ser testada ([www.agdia.com](http://www.agdia.com)) (Figura 6). Desde a década de 1970, quando iniciou-se a produção de anticorpos contra patógenos vegetais, a cada dia novos testes são disponibilizados. Para doenças viróticas, os imunoenaios aparecem como uma alternativa muito viável tanto na facilidade de execução como no custo do teste, que identifica, por exemplo, viroses latentes em alho e orquídeas, produtos de grande valor no mercado nacional que agregam grupos de viroses, dificultando o diagnóstico visual dos sintomas (DUARTE, 1996).

Especificamente para pastagens, empresas como a Agdia comercializam Kits de diagnóstico para “Johnsongrass Mosaic Vírus” (sinonímia de vírus do mosaico anão do milho), causando lesões necróticas em sorgo, milho e gramíneas em geral (TOSIC *et al.*, 1990); para “Maize chlorotic mottle virus”, gênero *Machlomovirus*, infectando milho, trigo, cevada, centeio e gramíneas forrageiras (MURPHY *et al.*, 1995) e para “Barley Yellow Dwarf Virus-PAV”, doença que ataca aveia, centeio, trigo e outras gramíneas (HENRY e FRANCKI, 1992).

### Plantas transgênicas

O grande salto na utilização dos imunoenaios veio com a liberação de transgênicos, tanto na identificação do produto, como sendo de origem transgênica, quanto na “fabricação” do produto. Um imunoenaiio pode conter anticorpos específicos para uma proteína transgênica e assim verificar sua expressão na planta transformada, através de um Western Blot. Neste caso, o imunoenaiio é o teste que de fato certifica se o gene inserido vai expressar a proteína de interesse na planta. Para o merca-

do, existem kits capazes de certificarem alimentos transgênicos, para assim rotularem os produtos, por exemplo, soja transgênica e derivados ([www.biogeneticservices.com/elisagmo.htm](http://www.biogeneticservices.com/elisagmo.htm)).

### APLICAÇÃO NA ÁREA ANIMAL

Os imunoenaios se somam às alternativas de possibilidades analíticas para a determinação das mais diferentes substâncias em matrizes animais. Em muitos casos, são utilizados como técnicas auxiliares no preparo de amostras, com destaque para as colunas de imunoafinidade e o rápido diagnóstico por ELISA.

### Resíduos de esteróides anabolizantes

Hormônios são substâncias específicas, produzidas por células especializadas, lançadas na corrente vascular e que agem sobre órgãos e tecidos definidos, modificando-lhes a estrutura e função. De maneira geral são efetivos em concentrações extremamente baixas, em níveis inferiores a nanogramas por mililitros ou por kilogramas (CANTAROW e TRUMPET, 1962).

Um agente anabolizante pode ser definido como uma droga que afeta a função metabólica (anabolismo e catabolismo) produzindo uma rede de efeitos e aumentando a deposição de proteínas. Os mais relevantes e desejáveis efeitos dos anabolizantes na promoção do crescimento em animais domésticos são: induzir a um considerável aumento na deposição de proteínas, com uma concomitante diminuição na gordura da carcaça e melhorar a eficiência da conversão alimentar. Há tempos têm-se apontado o uso de esteróides anabolizantes (EA) na pecuária para melhorar a eficiência alimentar e aumentar o ganho de peso. Em ambas as atividades, o controle do uso ilícito dessas substâncias se faz necessário (LONE, 1997; PASCHOAL *et al.*, 2004).

Os EA podem ser classificados como biologicamente endógenos, que são os compostos hormonais esteróides naturalmente presentes no animal (testosterona, progesterona e estradiol 17- $\beta$ ), ou biologicamente exógenos, que são divididos em Xenobióticos (acetato de trembolona (TBA), acetato de malengestrol (MGA) e zeranol), Esteróides sintéticos (etinilestradiol e metiltestosterona) e os Estilbenos (dietilestilbestrol (DES) e hexoestrol) (PATTERSON e SALTER, 1985).

A regulamentação oficial para a utilização de hormônios na produção animal varia entre os países. Destaca-se que somente o dietilestibestrol (DES) tem uso proibido em todo o mundo devido ao seu comprovado efeito carcinogênico (COLLINS *et al.*, 1989). A Comunidade Européia proibiu o uso de anabolizantes em animais (88/146/EC), não permitindo a comercialização e a importação de carnes que apresentem resíduos dessas substâncias. Em alguns países como Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Argentina e Estados Unidos é permitido o uso dos compostos anabolizantes naturais tais como testosterona, progesterona, 17 b-estradiol e dos sintéticos zeranol e TBA. Nesses países, são controlados somente os resíduos dos compostos sintéticos com Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (COLLINS *et al.*, 1989; LONE, 1997). No Brasil, a partir do dia 24 de maio de 1991, foram proibidos a importação, produção, comercialização e uso de substâncias naturais ou artificiais, para fins de crescimento e/ou engorda de animais de abate, com permissão apenas para fins terapêuticos, sincronização de ciclo estral e preparação de doadoras e receptoras para a transferência de embriões (PASCHOAL *et al.*, 2004).

Diversas matrizes podem ser utilizadas para a determinação de substâncias anabolizantes e seus metabólitos em animais como músculo (incluindo órgãos como fígado e rim), leite, sangue (plasma ou soro) urina e pêlos.

Na determinação de resíduos hormonais nos animais, metodologias diferentes podem ser utilizadas, como os imunoenaios do tipo ELISA e RIA; ou os métodos físico-químicos de separação acoplados a diferentes sistemas de detecção, como cromatografia gasosa ou líquida e eletroforese capilar, acoplados a detectores de absorvância (destaque para o DAD: arranjo de diodos), fluorescência, cintilação em fluxo, eletroquímicos e espectrometria de massas. A desvantagem destes métodos cromatográficos é o custo e tempo para cada amostra gerar um resultado, além da preparação das amostras (purificação, derivatização) (GODFREY, 1998).

A questão inicial a ser considerada quanto à determinação de EA em uma determinada matriz biológica, ou seja, tipo de amostra (sangue, fígado, urina, fezes), é a viabilidade de analisar o material

sem um preparo de amostra como extração, limpeza e concentração. No entanto, para se alcançar uma decisão quanto ao uso da análise direta, a seletividade da quantificação final e os requerimentos de análise devem ser levados em consideração. Esse é o ponto que atribui grande vantagem ao uso de imunoenaios para tal fim. Durante o metabolismo, os esteróides se tornam mais polares pela esterificação com ácido glucurônico ou sulfúrico, resultando na formação de conjugados como glucuronídeos e sulfatos (Salo *et al.*, 1996). Sendo assim, a determinação de EA nas mais diversas matrizes animais consiste na detecção destas substâncias na forma livre e esterificada. Para a determinação de EA esterificados, muitos pesquisadores utilizam a reação de hidrólise, com sistema enzimático da b-glucuronidase/sulfatase ou hidrólise ácida. Os imunoenaios permitem que as amostras sejam analisadas sem passar pelo processo de hidrólise (SHINOHARA *et al.*, 2000).

O uso de anticorpos monoclonais para estes ensaios de determinação EA tem sido realizados para diagnose de diversos anabolizantes por apresentar resultados rápidos e confiáveis, detectando níveis ao redor de 0,05 ppm das substâncias monensinas, oxytetracycline, trembolona, zeranol, carbadox, closantel, flubendazole e ivermectina em galinhas, perus, bovinos e caprinos (WATANABE *et al.*, 1998).

Também têm sido utilizados em ensaios utilizando pêlos de animais (vacas) para detecção de b-agonistas como clenbuterol, bromobuterol, mapenterol e mabuterol, sem apresentar reações cruzadas os falsos positivos. Os ELISAs neste caso, podem detectar quantidades mínimas destas substâncias utilizadas de forma ilegal no rebanho (HASSNOOT *et al.*, 1998).

Embora de uso proibido no Brasil, os anabolizantes são adquiridos dos Estados Unidos, México, Colômbia e Argentina, onde estes produtos são permitidos e o DES é contrabandeado via Paraguai, além da disponibilidade destas substâncias via internet. De acordo com a fiscalização brasileira (MAARA, 1994), somente amostras de carne para exportação são analisadas. Esta baixa porcentagem é devido à falta de mais laboratórios credenciados e ao fato que os imunoenaios (ELISA e RIA) apesar de práticos e de alta sensibilidade, tornam-se inviáveis devido ao custo dos reagentes e dos kits, que são em sua totalidade importados.

Em 1995 foi determinado pelo *Codex alimentaris*, que os produtos 17 $\beta$ -estradiol, testosterona e progesterona seriam seguros à saúde, o acetato de trembolona e o zeranol também seguros desde que em doses inferiores a 2 e 10 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente e o dietilestilbestrol como potencialmente tóxico (NETO, 1998).

### Resíduos de Antimicrobianos

Os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, sendo utilizados na produção animal para (i) tratar enfermidades (terapêutico), (ii) prevenir contra enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos (profilático), e (iii) melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento) (ANADÓN e MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

Uma grande variedade de substâncias antimicrobianas é usada na produção animal em todo o mundo. Seu uso leva, inevitavelmente, à seleção de formas resistentes de bactérias em relação ao agente ativo da substância utilizada, tema esse de grande importância quanto à saúde humana. Nos últimos anos, verifica-se uma preocupação crescente quanto ao uso dessas substâncias em dietas animais. Os antimicrobianos que mais receberam atenção neste sentido são a tetraciclina e a penicilina. Embora não tenha sido possível alcançar evidências concretas de risco à saúde humana associado a essas substâncias, alguns países, independentemente destes estudos, têm tomado decisões que visam banir o uso de antibióticos e quimioterápicos em dietas para animais destinados ao consumo humano (BELLAYER, 1999). Exemplo concreto é a atitude do governo da Suécia que, em 1986, impôs o banimento de antimicrobianos como promotores de crescimento, sendo que os antibióticos e quimioterápicos somente poderiam ser empregados na produção animal com o propósito de prevenção ou terapia de doenças (BUTOLO, 1999).

Em 1970, o "Food and Drug Administration" (FDA) estabeleceu um comitê permanente para avaliar a eficácia dos antimicrobianos na alimentação animal, resultando, em 1972, na retirada da penicilina e tetraciclina das listas de aditivos. A mesma medida foi adotada pela Comunidade Européia em 1976 (ANADÓN e MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999) e pelo Brasil, através da Portaria nº 159 de 23/06/92. A

Comissão Canadense de Certificação de Produção Animal Orgânica (COCC, 1997) estabeleceu, entre outros aspectos, a proibição do uso intencional de esterco e de promotores de crescimento na alimentação de animais, como antibióticos, hormônios, uréia e elementos traços utilizados para estimular o crescimento.

De modo geral, verifica-se uma tendência mundial no sentido da proibição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento com vistas a eliminar o potencial risco da resistência de bactérias aos antibióticos (BELLAYER, 1999). No entanto, os antimicrobianos usados para fins terapêuticos devem continuar sendo utilizados na produção animal, visto que, epidemias podem rapidamente disseminar-se numa criação, provocando alta mortalidade e levando a elevados prejuízos econômicos.

Os antimicrobianos comumente usados na produção animal, administrados via ração, incluem as seguintes classes de substâncias: beta-lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinoxalinas, sulfamídeos e quinolonas. As oxitetraciclinas são usadas em todo o mundo devido a grande amplitude de sua efetividade contra diversas espécies diferentes de bactérias e fungos (OKA *et al.*, 2000). Um número cada vez mais elevado de produtos contendo quinolonas está sendo aprovado e disponibilizado comercialmente para uso animal (Rose *et al.*, 1998). Todavia, o uso destas drogas requer informações detalhadas sobre suas propriedades farmacocinéticas, incluindo análise de resíduos destas em alimentos de origem animal (ANADÓN e MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

Os imunoenaios proporcionam excelente sensibilidade e especificidade para quantificação e detecção de moléculas haptênicas de baixo peso molecular, como é o caso dos antimicrobianos, sem necessidade de preparo da amostra (MANGEAU, 1998). O teste ELISA apresenta uma grande sensibilidade e nenhuma poluição radioativa na detecção de resíduos de cloranfenicol em alimentos de origem animal (SHI *et al.*, 2001), o que evidencia esta técnica como um teste eficiente para a detecção deste antibiótico.

### Adulteração de produtos

Adulteração de carnes – imunoenaios, baseados



em ELISA para certificar a espécie de animal contida no produto disponível no mercado. Por exemplo, testes para embutidos, certificando que não há mistura de espécies como gato ou cavalo, testes para pureza de espécie, principalmente por questões religiosas (judeus não consomem porco e Hindus não consomem carne bovina). Estes kits são disponibilizados por algumas empresas como Biopharm Rhone Ltd. (<http://www.r-biopharmrhone.com/pro/food/food1.html#meat>)

### Diagnóstico de doenças

Na área de sanidade animal, diversos imunoenaios são utilizados para diagnóstico das mais diversas patologias: coccidioses, babesiose, endoparasitas, febre aftosa, brucelose, tuberculose, toxoplasmose, febre maculosa etc. Tais testes apresentam as vantagens de se poder correr diversas amostras por unidade de tempo, com alta precisão, utilizando matrizes fáceis de obter, como saliva, sangue, urina ou fezes dos animais (PAULIN, 2003). Juntamente com as vacinas, os testes de diagnóstico para doenças animais, seja de grande porte (bovinos, bubalinos) ou da área pet (cães e gatos) são cada vez mais utilizados e novos produtos são lançados constantemente no mercado veterinário.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, o monitoramento da utilização de antimicrobianos, anabolizantes e outros xenobióticos é realizado pelo "Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR", instituído pela Portaria Ministerial n.º 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial n.º 527, de 15 de agosto de 1995. A execução de suas atividades está a cargo do Secretário de Defesa Agropecuária, cabendo ao Coordenador Geral gerenciar o cumprimento das metas estabelecidas na operacionalização do plano, o qual comporta ainda uma comissão técnica, com representantes do Departamento de Defesa Animal (DDA) e do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e um comitê consultivo, constituído por representantes de Órgãos Governamentais e Privados, reconhecidamente envolvidos no contexto do PNCR. Os produtos de uso veterinário são registrados e fiscalizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), onde a legislação que estabelece os limites máximos de resíduos (LMR) encontra-se na Normativa SDA/MAPA n.º42/1999.

Apesar desta infinidade de imunoenaios disponíveis no mercado, o Brasil carece de tecnologia própria. Hoje o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento importa todos os kits que utiliza, para fazer o controle de qualidade e sanidade, principalmente para os produtos destinados à exportação. Além da burocracia e o custo destas importações, a necessidade de desenvolvimento de tecnologia nacional deve-se principalmente a alta especificidade dos kits, que esbarram com pequenas e grandes diferenças quando usados em nossos produtos tipicamente tropicais, como adaptação a temperaturas altas, pequenas mutações em organismos de toda cadeia (insetos, vetores, parasitas, fitopatógenos), plantas nativas, animais "nacionalizados", enfim, há a necessidade real de desenvolvimento de kits e ensaios específicos à nossa fauna e flora e ao manejo utilizado, trazendo divisas para o país, minimizando custos com importação e desenvolvimento da pesquisa agropecuária.

Neste trabalho, gostaríamos de expandir os horizontes de utilização de imunoenaios, muito pouco explorados na pesquisa agropecuária brasileira e de extrema relevância no cenário internacional, disponibilizando metodologias a custos mais reduzidos que conferem ao produto confiabilidade e qualidade.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M.R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.59, n.2-3, p. 183-198, 1999.
- BELLAVER, C. Nutricionista frente a sustentabilidade da produção animal. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: 1999. p.1-22.
- BUTOLO, J.E. Aspectos econômicos dos aditivos nutricionais em animais de produção. In: SEMINÁRIO: O USO ADEQUADO DE ANTIMICROBIANOS COMO ADITIVOS MELHORADORES DA EFICIÊNCIA ALIMENTAR EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO. São Paulo: SINDAN, 1999. p.20-36.
- CANTAROW, A.; TRUMPET, M. **Clinical Biochemistry**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992. 776 p.
- COCC. Canadian Organic Certification Co-operative 1997.

- Organic Production Standards. <http://www.gks.com/cocc/manual/coccstd.html>
- COLLINS, S.S.; BELK, K.E.; CROSS, H.R. **Nutrition Reviews**, v.47, n.8, p.238-246, 1989.
- DUARTE, K.M.R. Anticorpos monoclonais aplicados à agricultura. **NAPMA**, série 2, 1996. 48 p.
- DUARTE, K.M.R. et al. Imunomarcção de esporos de fungos fitopatogênicos em Armadilhas caça-esporos para estudos epidemiológicos. In: ENCONTRO CIENTÍFICO DE PÓS-GRADUANDOS DA ESALQ,1., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: 2005. p.57
- GODFREY, M.A.L. Immunoaffinity extraction in veterinary residue analysis - a regulatory viewpoint. **The Analyst**, v.123, n.12, p.2501-2506, 1998.
- HASSNOOT, W. et al. A fast immunoassay for screening of B-agonists in hair. **The Analyst**, v.123, n.12, p.2707-2710, 1998.
- HAYDEN, J.M.; BERGEN, W.G.; MERKEL, R.A Skeletal muscle protein metabolism and serum growth hormone, insulin and cortisol concentrations in growing steers implanted with estradiol 17b, trembolone acetato, or estradiol-17b plus tre. with estradiol 17b, trembolone acetato, or estradiol-17b plus trenbolone acetate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.7, p. 2109-2119, 1992.
- HENRY, M.; FRANCKI, R. I. B. Improved ELISA for the detection of barley yellow dwarf virus in grasses. **Journal of Virological Methods**, v.36, p.231-238, 1992.
- HERMANSON, G.T. **Bioconjugate Techniques**. San Diego: Academic Press. 1996. 785 p.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, London, v.256, p.495-497, 1975.
- LONE, K.P. Natural Sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues, methods and epidemiology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, West Palm Beach, v. 37, n.2, p.93-209, 1997.
- LUENGO, M.B. Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento de doenças inflamatórias. **Revista Eletrônica da Farmácia**, v.2, n.2, p.64-72, 2005.
- MAARA. Relatório apresentado pelos membros da Comissão nomeada pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária através da Portaria no. 51 sobre o uso de promotores de crescimento hormonal em pecuária de corte. 1994. 130p.
- MAGEAU, R.P. Competitive enzyme-linked immunoassay (CELIA) for the detection and quantitation of chloramphenicol. In: USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook, 3. Washington, 1998.
- MURPHY F.A. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, New York, Suppl. 10, 1995. 586 p.
- NETO, J.P. Anabolizante e pecuária de corte. **Revista de Educação Continuada do CRMV**, São Paulo, v.1, n.1, p.10-15, 1998.
- OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 109-133, 2000.
- PASCHOAL, J.A.R.; DUARTE, K.M.R.; MEIRELLES, C.F. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.2, p.84-92, 2004.
- PATTERSON, R.L.; SALTER, L.J. Anabolic agents and meat quality: a review. **Meat Science**, v. 14, n.4, p.191-220, 1985.
- PAULIN, L.M. Brucelosa. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.70, n.2, p. 239-249, 2003.
- ROSE, M.D.; BYGRAVE, J.; STUBBINGS, W.F. Extension of multi-residue methodology to include the determination of quinolones in food. **Analyst**, v. 123, p. 2789-2796, 1998.
- SALO, M. et al. **Journal of Chromatography A**, v.728, p.83, 1996.
- SHI, D. et al. Preparation of chloramphenicol antiserum. **Journal of Huazhong Agricultural University**, v.20, n.5, p.463-465, 2001.
- SHINOHARA, Y.; ISURUGI, K.; HASHIMOTO, T. **Journal of Chromatography B**, v.741, p.271-278, 2000.
- TOSIC, M. et al. Differentiation of sugarcane, maize dwarf johnsongrasses and sorghum mosaic viruses based on reaction of oat and some sorghum cultivars. **Plant Disease**, v. 74, n.8, p. 549-552, 1990.
- WATANABE, H. et al. Monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for monensin. **The Analyst**, v.123, n.12, p.2573-2578, 1998.