

Universidade de São Paulo
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

***Padronização e desenvolvimento de reagentes
imunoenzimáticos para pesquisa de ciprofloxacina em produtos
de origem animal***

Sarita Priscila Gobbo

Piracicaba

2006

Sarita Priscila Gobbo
Bióloga

**Padronização e desenvolvimento de reagentes imunoenzimáticos para
pesquisa de ciprofloxacina em produtos de origem animal**

Tese apresentada, para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente. Orientadora:
Prof^a Dr^a. Adriana Pinheiro Martinelli
Rodriguez

Piracicaba
2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Gobbo, Sarita Priscila

Padronização e desenvolvimento de reagentes imunoenzimáticos para pesquisa de ciprofloxacina em produtos de origem animal / Sarita Priscila Gobbo; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez. - - Piracicaba, 2006.

103 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Anticorpos 2. Antimicrobiano 3. Ensaio imunoenzimático
I. Título

CDU 57.083.33:637

Dedicatórias

Ao Bruno M. Ferrari por fazer parte da minha vida, por todo amor, a quem sinto profunda gratidão por tanto ter me auxiliado nessa conquista e a minha mãe Herminia G. Gobbo, mulher batalhadora, que me ensinou a lutar pelos meus ideias sempre dignamente.

Ofereço

Aos meus queridos sobrinhos Pedro e Lucas Fedrizzi, Julia e Lucas Corrêa por trazerem alegria a minha vida e a minha grande amiga-irmã Janaina Corrêa por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

A Profª Drª. Adriana Pinheiro Martinelli, pela amizade, carinho, por todos os esforços e principalmente por ter confiado e acreditado em mim....

Ao Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira, pela oportunidade dada para a realização desse projeto, pela orientação segura e amizade que me permite compartilhar, por ter-me guiado, apoiado e auxiliado, me estimulando a crescer profissionalmente, a quem devo total gratidão....

À Profª Drª. Sandra do Lago Moraes, um exemplo de vida e dedicação, agradeço pelo carinho e apoio, por me fazer acreditar que pra tudo tem um jeito nessa vida e por permitir compartilhar dessa amizade.....

À Fabiana M. Leoratti, por todos os “galhos quebrados”, por todas as contas resolvidas, por todo carinho e amizade.....

À Kelly Ap. Kanunfre, por ter se tornado uma grande amiga em São Paulo, companheira de todas as horas, que me auxiliou nos momentos mais difíceis, sempre acreditando que dias melhores virão e que ainda vai me agüentar por mais um bom tempo....

Aos amigos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP, Elaine Antunes Lemos, Kleber Jamal Contiero, Renata Tunis Santos, Melissa da Silva Bastos, Piero Lourenço, Ana Paula, Monica Kudó, Erika Hoffmann, Drª Guita Rubinsky Elefant, Drª Carmen Arroyo Sanches, Elisabete Ourique, por de alguma forma terem contribuído na execução desse projeto....

Aos funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP.....

Às secretárias do Instituto de Medicina Tropical da USP, Eunice Bonfim Pinto, Jandira Takeda, Vera Lucia Valbueno pela colaboração em todas as horas.....

Aos meus novos amigos Instituto de Medicina Tropical da USP-SP, Sandra, Edna, Prianti, Fabricio, Juliana, Junior, Adriano, Edite, por todo carinho e amizade....

Ao Dr. Ives Claudio da Silva Bueno, pela grande amizade e por todos os ensinamentos compartilhados durante todos os anos em que estive no CENA/USP que muito contribuíram para minha formação e por todos os churrascos e jantares.....

Ao Dr. Sergio Lucio Salomon Cabral Filho, amigo de todas as horas, companheiro e grande colaborador na minha formação....

À Dr^a Patrizia Ana Bricarello, minha grande amiga e conselheira, sempre me colocando pra cima e auxiliando nos momentos mais difíceis, a quem tenho profunda gratidão, espero compartilhar dessa amizade sempre.....

Às minhas queridas amigas Patrícia Godoy, Ana Paula Roque e Raquel Dias, por todo carinho e companheirismo em todas as horas, mostrando que sempre serão as “super-poderosas”.....

Aos amigos Alessandro Minho, Eduardo Nozzela, Antônio Baptista, por todo carinho, amizade e por todas as caronas....

À Maria Regina S. R. Pessanha pela amizade e pelo auxílio técnico e científico em diferentes etapas da minha vida....

Ao Lécio Ap. Castilho e Joaquim Everaldo M. dos Santos, pela amizade, carinho, dedicação e auxílio que foram fundamentais na excussão do experimento.....

À Silvana Pousa Maziero, pelo carinho, amizade e paciência que sempre teve comigo durante todos os anos em que estive no CENA/USP....

Às bibliotecárias Marília R. G. Henyei pelo grande trabalho que teve em me auxiliar nas correções referente a elaboração da tese e Renata Fini pelo grande auxílio nas pesquisas bibliográficas.....

Aos Drs. Adibe Luiz Abdalla e Dorinha M. S. S. V. Kennedy por cederem o biotério do Laboratório de Nutrição Animal do CENA para a execução desse projeto, bem como pelo apoio financeiro.....

Ao Prof. Dr. Flavio Tavares por ceder as dependências do seu laboratório bem como a ajuda e auxílio do Dr. Luis Humberto Gomes e sua esposa Keila M. R. Duarte....

À minha irmã querida Samanta M. G. Fedrizzi e ao meu cunhado Ricardo Fedrizzi por terem me ajudado nos momentos mais difíceis da minha vida, me acolhendo com todo carinho, sempre confiando em Deus.....

À Dr^a Siu Mui Tsai, por pelo grande apoio nos momentos mais difíceis, sempre solícita em todos os momentos....

Ao Fabio M. Ferrari por toda a paciência, por ter me emprestado seu computador e que muitas vezes acabei enchendo de vírus e principalmente pela amizade que construímos durante nossa convivência....

À Cláudia Márcia de F. Corrêa, Neuda Fernandes de Oliveira, Maria Regina Silveira Rodrigues, Alzira Ferraz Adão e ao Othon Abrahão por todo carinho e principalmente por sempre acharem uma solução para os problemas....

Aos engenheiros químicos Lauro César Ematne e Santiago, por todo apoio e ensinamento fundamentais para o desenvolvimento do projeto....

À Silvana e Cláudio Oliveira Guimarães por todo o carinho que sempre tiveram comigo, e a Marina Ematne que sempre me socorreu nos momentos de solidão em São Paulo....

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por permitir a idealização desse projeto de pesquisa....

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ por conceder a minha bolsa de estudo bem como todo o auxílio técnico....

À todas as pessoas que passaram pela vida durante essa longa jornada que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse projeto bem como trazendo palavras amigas....

À Deus, por estar presente na minha vida em todos os momentos.....

Muito Obrigada!!!!

Epígrafe

“A vida não é um corredor reto e tranqüilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída....

Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”

A. J. Pranin

Sumário

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. O agronegócio brasileiro.....	18
2.1.1. Avicultura nacional.....	22
2.1.2. Bovinocultura leiteira nacional.....	23
2.2. Antimicrobianos.....	24
2.2.1. Antimicrobianos na produção animal.....	25
2.2.2. Quinolonas e Fluoroquinolonas.....	28
2.2.3. Mecanismo de ação.....	31
2.2.4. Propriedades físicos-químicas.....	32
2.3. Resistência antimicrobiana.....	34
2.4. Efeitos prejudiciais dos resíduos antimicrobianos em humanos.....	37
2.5. Limite máximo de resíduos (LMRs).....	39
2.6. Monitoramento dos resíduos antimicrobianos.....	42
2.7. Métodos de análise residual.....	45
3. OBJETIVOS.....	51
3.1. Objetivo geral.....	51
3.2. Objetivos específicos.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1. Animais.....	52
4.2. Preparo de antígenos para as imunizações.....	53
4.3. Protocolo de imunizações.....	55
4.3.1. Preparação do imunógeno com o adjuvante.....	55
4.3.2. Ciclo das imunizações.....	55
4.4. Colheita e armazenamento do sangue.....	57
4.5. Estudo da reposta imune dos soros colhidos semanalmente.....	57
4.6. Abate dos animais imunizados.....	59

4.7. Estudo das diluições dos soros	59
4.7.1. Fase sólida	59
4.8. Purificação de soro de coelho anti-ciprofloxacina-cBSA	61
4.8.1. Separação da gama globulina de coelho anti-ciprofloxacina-cBSA.....	61
4.8.1.1. Absorção da IgG de coelho purificada	62
4.8.1.2. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	63
4.9. Preparo dos conjugados enzimáticos IgG de coelho anti-ciprofloxacina e da ciprofloxacina	64
4.9.1. Conjugado enzimático IgG de coelho anti-ciprofloxacina – peroxidase	64
4.9.1.1. Avaliação do conjugado enzimático IgG de coelho anti-ciprofloxacina – peroxidase por ELISA.....	65
4.9.2 Conjugado enzimático IgG de coelho anti-ciprofloxacina – biotina.....	66
4.9.2.1. Avaliação do conjugado enzimático IgG de coelho anti-ciprofloxacina – biotina por ELISA	66
4.9.3. Conjugado enzimático ciprofloxacina – peroxidase.....	67
4.9.3.1. Avaliação das diluições da IgG de coelho anti-ciprofloxacina utilizando a ciprofloxacina conjugada com a peroxidase do kit RIDASCREEN® Enro/Cipro.....	69
4.9.3.2. Avaliação da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase juntamente com a IgG de coelho anti-ciprofloxacina	70
4.9.3.3. Padronização do ELISA de competição	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1. Preparo do antígeno	72
5.2. Estudo da reposta imune dos soros.....	76
5.2.1. Estudo das diluições dos soros.....	78
5.3. Purificação da IgG de coelho.....	80
5.4. Conjugados enzimáticos.....	83
5.5. Avaliação das diluições da IgG de coelho anti-ciprofloxacina utilizando a ciprofloxacina conjugada com a peroxidase do kit RIDASCREEN® Enro/Cipro	84
5.5.1. ELISA: ciprofloxacina – peroxidase e IgG de coelho anti-ciprofloxacina purificada	86
5.5.2. Padronização do ELISA de competição.....	87
6. CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIA.....	93

RESUMO

Padronização e desenvolvimento de reagentes imunoenzimáticos para pesquisa de ciprofloxacina em produtos de origem animal

O crescimento cada vez maior da industrialização e a existência de um mercado globalizado vêm exigindo dos produtores rurais a utilização de modernas tecnologias ligadas à produção animal. O baixo custo de produção e o aumento da qualidade do produto final gerado têm sido a grande meta dos pecuaristas e centros de pesquisa voltados à agropecuária. Devido à necessidade de aumento na produção, propriedades agropecuárias têm recorrido ao uso de todo e qualquer recurso disponível que possa promover melhorias na atividade produtiva. O uso indiscriminado dos antimicrobianos com a intenção de aumentar a produção animal pode resultar em concentrações residuais nos produtos como carne, ovos e leite acima das doses aceitáveis para o consumo humano. Inicialmente, os antibióticos eram usados como medida terapêutica, mas com o avanço do conhecimento e desenvolvimento de novos compostos, passaram a ser utilizados também como medida preventiva e como promotores do crescimento. O que se deve questionar não é a presença destes resíduos, mas sim o tipo e as concentrações dos mesmos. De fato, as modernas tecnologias analíticas têm permitido a detecção de partes por bilhão de substâncias químicas, componentes ou metabólitos de medicamentos de uso veterinário em alimentos e, nestas quantidades, dificilmente elas representariam perigo à saúde dos consumidores. Portanto, há necessidade de se estabelecer metodologias analíticas mais eficientes que possam auxiliar os órgãos de fiscalização da agricultura no controle do uso desses antimicrobianos na produção animal. Assim como auxiliar no controle de qualidade, principalmente em indústrias exportadoras que almejam expansão de mercado, onde essa prática é quase uma imposição no contexto do comércio internacional de produtos pecuários “in natura” e processados. Devido a essas necessidades, o objetivo do presente foi padronizar e desenvolver reagentes imunoenzimáticos para a pesquisa da ciprofloxacina em produtos de origem animal. Os resultados obtidos no desenvolvimento desses imunoreagentes foram positivos quando correlacionado ($r^2 = 0,9588$) com o kit referência *RIDASCREEN® Enro/Cipro* da *R-Biopharm*. Diante disso, é possível concluir que o Brasil possui infra-estrutura adequada para padronizar esses testes rápidos, evitando com isso um grande gasto na importação desses kits.

Palavras-chave: antimicrobianos; anticorpos; ensaios imunoenzimáticos; imunoreagentes; padronização.

ABSTRACT

Standardization and development of immunoenzymatics reagents for ciprofloxacin in animal products

The growth each time higher of industrialization and the existence of a global market forces the rural producers to use modern technologies related to animal production. The low production cost and the increasing of obtained final product quality have been the great aim of cattle farmers and cattle farming research centers. Due to the necessity of increasing the production, rural properties have required the use of any available source able to promote better productive activities. The indiscriminated antibiotics use aiming to increase animal production may result in residual concentrations found in products such as meat, eggs and milk over acceptable doses to the human consumption. Firstly, antibiotics were used as therapeutic prescriptions although the advances on knowledge and development of new compounds were also used as a preventive way and as growth promoters. What must be questionable its not the presence of these residuals but surely what kind of residual and their concentrations. In fact, the modern analytic technologies make possible the detection of parts per billions (ppb) of chemical substances, compounds or medicine metabolites of veterinary use in food and in these quantities, hardly they would be dangerous to the consumer health. However, it's necessary to establish more efficient analytic methodologies to help on agriculture supervising organs in the control of these antibiotics use in the animal production. Thus, how to help in the quality control, mainly in industries that export to get the market expansion, where this activity is almost an imposition at the international trade context of farming products "in natura" and industrialized ones. Due to these necessities, the goal of our present work was to standard and develop immunoenzymatics reagents to the ciprofloxacin researching from animal products. The results obtained on development of these immunoreagents were positive when correlated ($r^2 = 0,9588$) to the kit *RIPASCREEN® Enro/Cipro* from *R-Biopharm* reference. At the light of these knowledge, it's possible to conclude that Brazil has adequate proper-structure to standardize these quick tests, to avoid in this way a high cost to import these kits.

Keywords: antimicrobials; antibody; Enzyme Linked Immunosorbent Assay; imunoreagents; standardization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das quinolonas e fluoroquinolonas.....	29
Figura 2. Coelhos utilizados no experimento mantidos em gaiolas metabólicas.....	52
Figura 3. Imunizações em diferentes sítios.....	56
Figura 4. Colheita de sangue da veia marginal do coelho.....	57
Figura 5. Processo de conjugação das moléculas ciprofloxacina e BSA cationizado utilizando o reagente <i>Imject® Pharmalink™ Immunogem Kit</i>	76
Figura 6. Resultados da titulação no teste ELISA dos soros colhidos semanalmente dos animais imunizados	78
Figura 7. Resultados das D.Os para avaliação da produção de anticorpos nos coelhos imunizados frente ao conjugado ciprofloxacina-cBSA na concentração de 10 µg/ml.	79
Figura 8. Resultados da purificação da IgG de coelho, avaliando a eficiência das frações dos soros IgG total, anti-ciprofloxacina e anti-BSA, frente a diferentes antígenos utilizando a mesma concentração.....	81
Figura 9. Avaliação das diluições da IgG de coelho anti-ciprofloxacina, utilizando os reagentes do <i>kit</i> referência.....	85
Figura 10. Avaliação da eficiência dos imunoreagentes produzidos <i>in house</i> , em diferentes situações.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites Máximos de Resíduos (LMRs) considerados seguros para o consumo humano da soma da ciprofloxacina com a soma da enroloxacina estabelecido pelo Concil Regulation nº 2377/90.	41
Tabela 2. Cronograma da produção de anticorpos compreendendo imunização, colheita de sangue e sangria.	56
Tabela 3. Densidades ópticas obtidas no teste ELISA dos soros colhidos semanalmente dos animais imunizados	77
Tabela 4. Correlações entre as diferentes diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800) da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase, utilizando o soro IgG de coelho anti - ciprofloxacina a 1/10, frente aos resultados obtidos do kit referência RIDASCREEN® Enro/Cipro	86

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ABS:</i>	Absorbância
<i>APINCO:</i>	Associação Brasileira dos Produtores de Pinto de Corte
<i>ATP:</i>	Trifosfato de Adenosina
<i>BSA:</i>	Soro Albumina Bovina
<i>cBSA:</i>	BSA cationizado
<i>CG-MS:</i>	Cromatografia Gasosa de Massa
<i>CLAE:</i>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>CMI:</i>	<i>Concentração Mínima Inibitória</i>
<i>D.O:</i>	Densidade óptica
<i>DMF:</i>	Dimetilformamida
<i>DNA:</i>	Ácido Desoxirribonucleico
<i>EEC:</i>	Council Regulation
<i>ELISA:</i>	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
<i>FAO:</i>	Food and Agriculture Organization
<i>FDA:</i>	Food and Drug Administration
<i>H₂O₂:</i>	Peróxido de Hidrogênio
<i>H₂SO₄:</i>	Ácido Sulfúrico
<i>HCL:</i>	Ácido Clorídrico
<i>HPLC:</i>	High Performance Liquid Chromatography
<i>IBGE:</i>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>KCL:</i>	Cloreto de Potássio
<i>LMRs:</i>	Limite Máximo de Resíduos
<i>MAPA:</i>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>MES:</i>	2-ácido 2-(N-morfolina)-etanosulfônico
<i>MgCl₂:</i>	Cloreto de Magnésio
<i>NaCl:</i>	Cloreto de Sódio

<i>NaHB₄</i> :	Boridreto de Sódio
<i>NaIO₄</i> :	Metaperiodato de Sódio
<i>OIE</i> :	Organização Mundial para a Saúde Anima
<i>OMC</i> :	Organização Mundial do Comércio
<i>OMS</i> :	Organização Mundial da Saúde
<i>PAMvet</i> :	Programa de Análise de resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos
<i>PAMvetPr</i> :	PAMvet do Estado do Paraná
<i>PBS</i> :	Solução salina tamponada com fosfatos (phosphate buffer saline)
<i>PBS-T</i> :	PBS contendo tween 20
<i>pI</i> :	ponto isoelétrico
<i>PIB</i> :	Produto Interno Bruto
<i>RNA</i> :	Ácido Ribonucléico
<i>rpm</i> :	Rotação por minuto
<i>TMB</i> :	Tetrametilbenzidina
<i>UV</i> :	Luz ultravioleta

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS

$\mu\text{g/g}$: microgramas por gramas

μg : micrograma

μl : microlitro

g/ton : grama por tonelada

h : hora

kcal/mol : quilocalorias por mol

kg : quilograma

M : Molar

mg : miligramas

ml : mililitro

mM : milimolar

N : normal

ng : nanograma

$^{\circ}\text{C}$: Graus Celsius

rpm : rotação por minuto

1. Introdução

O desenvolvimento da industrialização de produtos e a existência de um mercado cada vez mais globalizado vêm exigindo dos produtores rurais a utilização de modernas tecnologias voltadas para produção e criação dos animais. O fomento da atividade agroindustrial está intimamente ligado aos financiamentos e apoio dos órgãos governamentais, porém, a falta de esclarecimento aos produtores rurais sobre os subsídios governamentais implementados, aliados a uma política de financiamentos a juros elevados, além da ausência de medidas protecionistas ligadas aos produtos nacionais, tem colocado nossos produtores rurais em situação de real desvantagem neste mercado.

Diante dos fatos, a grande meta dos pecuaristas e centros de pesquisa voltados ao desenvolvimento agropecuário está em desenvolver metodologias que possam permitir aos produtores rurais aumentar sua produção além de melhorar a qualidade final do produto, aliados aos baixos custos de produção. Isso fez com que os avanços em relação ao melhoramento genético, nutrição e manejo, resultassem em animais prontos para o abate em tempo menor, decorrente de diferentes medidas, entre elas a utilização de antimicrobianos na sua alimentação.

Inicialmente, os antimicrobianos eram utilizados somente como medida terapêutica, mas com o avanço do conhecimento e desenvolvimento de novos compostos, passaram a serem utilizados também como preventivos e promotores de crescimento nas criações animais.

As fluoroquinolonas representam uma das melhores classes de agentes antimicrobianos utilizados em medicina humana e veterinária para o tratamento de inúmeras infecções bacterianas. O considerável sucesso desses produtos sintéticos

pode ser atribuído ao seu amplo espectro de atividade, toxicidade mínima sobre os organismos eucariotes, fácil penetração na maioria das células bacterianas e boas propriedades farmacocinéticas (Brown, 1996; Couturier et al., 1998; Blondeau, 1999).

Porém, o uso indiscriminado dessas fluoroquinolonas pode deixar resíduos nos derivados dos produtos animais, justificando a necessidade do monitoramento dessas substâncias (Heitzman, 1993). O desenvolvimento da resistência bacteriana em humanos relacionado ao uso indiscriminado desses fármacos na produção agropecuária tem sido alvo de diversos trabalhos de pesquisa (Garau et al., 1999; Malorny *et al.*, 1999; Smith et al., 1999).

O aparecimento e a dispersão das bactérias resistentes a estas e outras drogas ocasionam obstáculos aos procedimentos clínicos empregados em seres humanos, aumentando os custos dos tratamentos e como consequência as taxas de morbidade e mortalidade na população (Padilha, 2000).

Cada vez mais se estabelece uma relação entre os alimentos e a saúde dos indivíduos. O termo "consumo consciente" torna-se mais comum e evoca um consumidor que compra produtos julgando serem produzidos sob condições que preservam o meio ambiente e que são pautados pela responsabilidade social.

Isso tudo fez com que os órgãos governamentais atentassem sobre os riscos no consumo de produtos de origem animal contendo algum tipo de resíduo antimicrobiano, e começaram então a estabelecer um controle rígido na qualidade desses alimentos quanto à presença dos mesmos.

Portanto, há grande necessidade de estabelecer metodologias analíticas mais rápidas, eficientes e de baixo custo operacional que tenham a capacidade de detectar quantias ínfimas desses resíduos nos tecidos e órgãos de animais

destinados às produções de leites, carnes, ovos e mel. Com essas implementações biotecnológicas será possível auxiliar os órgãos de fiscalização da agricultura no controle do uso desses antimicrobianos em produtos de consumo destinados à exportação, bem como assegurar ao consumidor a qualidade do alimento que irá ingerir. Estas implementações trarão um grande benefício econômico principalmente para o Brasil, que importa reagentes para detecção desses resíduos, pois no futuro, os produtos com esse apelo de ausência de resíduos não serão mais produtos diferenciados, mas sim sinônimos de alimentos saudáveis e com grande qualidade.

Devido a essas necessidades, o objetivo do presente projeto de pesquisa visou o desenvolvimento de reagentes imunoenzimático para a pesquisa e quantificação da ciprofloxacina em matrizes biológicas, com a perspectiva futura de desenvolver um kit imunoenzimático para detectar esses resíduos não somente nesses produtos, mas também em outros produtos como ovos, carnes bovina, suína e de frangos, além de pescados e mel.

2. Revisão de literatura

2.1. O agronegócio brasileiro

Com um clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e quase 13% de toda a água doce disponível no planeta, o Brasil tem 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade, dos quais 90 milhões ainda não foram exploradas. Esses fatores fazem do país um lugar de vocação natural para a agropecuária e todos os negócios relacionados à suas cadeias produtivas. O agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira e responde por R\$ 1,00 em cada R\$ 3,00 gerados no país (BRASIL, 2006).

A expansão do agronegócio brasileiro e no mundo vem despertando o interesse de diversos segmentos da sociedade visando à melhoria e o desenvolvimento desse complexo setor. O grande impulso desse setor se deu entre as décadas de 70 e 90 juntamente com o desenvolvimento da ciência e tecnologia, proporcionando o domínio de regiões antes consideradas inóspitas para a agropecuária, tendo como consequência um aumento na oferta de um grande número de produtos (Oliveira, 2006a).

A série histórica anual de 1989 a 2004 da balança comercial brasileira e do agronegócio, divulgada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA confirma o crescimento expressivo desse setor. No período acima citado, a contribuição média do agronegócio para o PIB nacional foi de US\$ 15 bilhões. Fato que pode ser considerado extraordinário quando se observa que o país, em período anterior a esse, consumia sua produção interna e mais importava do que exportava (Oliveira, 2006a).

Em termos de exportação, pela falta de tecnologias mais modernas, basicamente os setores cafeeiro e canavieiro contribuíam para esse aumento no agronegócio. Atualmente, produtos oriundos do complexo de soja, carnes e derivados de animais, açúcar e álcool, madeira (papel, celulose e outros), café, chá, fumo, tabaco, algodão e fibras têxteis vegetais, frutas e derivados, hortaliças, cereais e derivados e a borracha natural são itens importantes da pauta de exportação brasileira. Apesar do MAPA considerar que o ano de 2005 foi um ano “apenas razoável” para a agropecuária, ainda assim, a contribuição do agronegócio para o PIB foi vital para a economia nacional.

Nos próximos 10 anos, com o avanço e implementações de tecnologias agrícolas tanto para agricultores inseridos no Programa de Agricultura Familiar do Governo Federal como para os médios e grandes produtores, a expectativa é de que várias outras *commodities* agrícolas possam ocupar patamares ainda mais expressivos no mercado internacional (BRASIL, 2006).

As instituições de pesquisa e ensino do país contribuíram e vêm ainda contribuindo para o sucesso do agronegócio brasileiro no desenvolvimento de tecnologias de produção e de variedades agrícolas adaptadas aos diferentes ecossistemas (Oliveira, 2006b). Entretanto, os passos do passado que promoveram o agronegócio no patamar conhecido necessitam continuar a ser desenvolver, já que outros grandes desafios estão batendo às portas do país. Um desses desafios envolve a saúde animal e sanidade vegetal. Em termos de agronegócio e de trocas comerciais em nível nacional e internacional, problemas sanitários estão direta e indiretamente relacionados às barreiras sanitárias que, diferentemente das barreiras tarifárias levam anos para serem resolvidas.

Nos últimos anos, o país vivenciou situações de alto desgaste econômico

e social devido à implementação de barreiras sanitárias em seus produtos além das perdas de mercados provocadas por problemas sanitários. A detecção da febre aftosa no estado do Mato Grosso do Sul, a introdução e dispersão da ferrugem da soja, a mosca-branca, o nematóide do cisto da soja, o caramujo-gigante-africano, entre outras pragas às quais podem ser citadas como protagonistas desses processos (BRASIL, 2006).

Apesar do empenho das pesquisas científicas, as resoluções dos problemas de sanidade vegetal e saúde animal não têm acompanhado os avanços do uso intensivo das tecnologias agropecuárias, sendo um dos fatores, a descontinuidade ou restrição de recursos orçamentários e financeiros.

O desenvolvimento de pesquisas técnico-científicas para a implantação de políticas públicas em segurança biológica para proteção do agronegócio brasileiro deve ser prioridade do Governo Federal. A entrada de pragas em áreas do sistema produtivo traz conseqüências dramáticas e muitas vezes irreversíveis para a agricultura. Além de gastos da ordem de milhões de reais para o controle e erradicação desses organismos, ocasionando perdas na biodiversidade, nos recursos biológicos e genéticos, levam a um grande impacto na indústria alimentícia pela falta dos produtos primários e como conseqüência desemprego na área rural.

Assim como o agronegócio necessita da ciência e a tecnologia para promover a sua expansão, precisa também promover o desenvolvimento da qualidade de seus produtos e da mão-de-obra qualificada para se consolidar cada vez mais nos mercados nacional e internacional.

Organizações internacionais ligadas ao comércio, saúde humana e animal, sanidade vegetal, proteção dos consumidores e ao meio ambiente vêm propondo normas e procedimentos para melhorarem a qualidade dos produtos

oriundos do agronegócio, bem como para diminuir os riscos e as barreiras sanitárias. Apesar da Organização Mundial do Comércio (OMC) ter iniciado suas operações em 1º de janeiro de 1995, estabelecendo o *Acordo de Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias* (acordo SPS) para a aplicação de regulamentos em proteção de plantas, saúde animal e segurança alimentar, relacionados ao comércio agrícola internacional, há necessidade dos países desenvolverem suas próprias diretrizes, visando proteger seus interesses (Oliveira, 2006b).

O país precisa então preparar seu segmento técnico-científico para o entendimento dessas normas, estar preparado para divulgá-las além de estimular as demandas de pesquisa e educação para a solução dos problemas considerados vitais para o segmento, sob pena de o país ter um futuro dependente ou a mercê das decisões internacionais.

Como não há estímulos no país para o desenvolvimento de tecnologias de ponta nos diversos segmentos da sociedade, cabe ao agronegócio o papel de contribuir para o desenvolvimento e melhoria da qualidade de vida dos habitantes. Com uma responsabilidade tão grande para o segmento, é mais do que justo que o Governo Federal, incluindo os poderes Legislativo e Executivo, façam a sua parte, priorizando e aprovando orçamentos e no estabelecimento de legislações alinhadas com os paradigmas internacionais, o que, certamente ajudaria a eliminar algumas das barreiras não-tarifárias atualmente impostas ao país. Essas e outras ações contribuíram concretamente para os avanços da ciência e tecnologia no agronegócio brasileiro.

2.1.1. Avicultura nacional

A avicultura nacional e mundial teve um grande desenvolvimento, conseguindo atingir um elevado índice de produtividade nos últimos 30 anos. Fato esse comprovado, pois na década de 70 era necessário em média 70 dias para o crescimento e engorda de um frango de corte que, consumia em média 2 kg de ração para 1 Kg de ganho de peso. Atualmente um frango de corte fica pronto para abate aos 45 dias, consumindo em média 1,8 Kg de ração com conversão alimentar de 2,4 Kg de ganho de peso vivo (Miele e Gyrotto, 2006).

O sucesso da avicultura nacional, no entanto, não ocorreu por acaso, foi decorrência direta do surpreendente avanço de conhecimentos ligados à seleção genética e de manejo das aves, além dos avanços farmacológicos que trouxeram nesse sentido uma inestimável contribuição nesse setor (Palermo-Neto et al., 2005).

Baseada na produção de pintos de corte, a Associação Brasileira dos Produtores de Pinto de Corte (APINCO) concluiu que no segundo mês de 2006 foram produzidas no Brasil 755,395 mil toneladas de carne de frango, volume 13% superior ao registrado em fevereiro de 2005. No primeiro bimestre de 2006, a produção brasileira de carne de frango totalizou 1,612 milhões de toneladas, volume 14% superior ao registrado no mesmo período de 2005 e que projeta, para a totalidade do ano, produção em torno dos 9,6 milhões de toneladas, 3,5% a mais que o produzido no ano passado (AVISITE, 2006).

O destaque da avicultura no agronegócio brasileiro nas últimas décadas está intimamente ligado ao incremento tecnológico alavancado pela destacada articulação entre os diferentes agentes que a compõem. Assim, a cadeia produtiva

de aves de corte assegura ao país uma posição de destaque no cenário mundial (Miele e Gyrotto, 2006).

O aumento na produção, exportação e consumo da carne de frango nacional foram acompanhados pelas adaptações das instalações de granjas e por uma evolução nos parâmetros zootécnicos como genética, manejo, nutrição e sanidade das aves (Silva, 2004).

2.1.2. *Bovinocultura leiteira nacional*

A produção de leite é tradicionalmente associada ao baixo uso de tecnologias, à qualidade reduzida e à rentabilidade marginal, fadada, portanto, a se desenvolver em regiões e propriedades que não se prestam a outras atividades mais rentáveis. Com o crescimento do agronegócio de exportação, juntamente com a aplicação tecnológica aderida na integração da cadeia de suprimentos, produção e processamento, a idéia de que o leite não era um produto tão rentável, passou a ser observada de outra forma pelo agronegócio.

As mudanças no início da década de 90, com a abertura da economia, liberação de preços e o plano de estabilização, trouxeram modificações importantes para toda a cadeia agroindustrial do leite, aumentando os investimentos no setor. O novo cenário foi reforçado com a implementação do Plano Real em 1994, aumentando o mercado consumidor e viabilizando aumentos de produção (Carvalho et al., 2006).

Frente às perspectivas positivas, o pecuarista de leite investiu na sua produção. Dessa forma, a oferta de leite sob inspeção, no primeiro semestre de 2005, chegou a 7,8 bilhões de litros, 13,3% a mais que os 6,9 bilhões de litros

produzidos no primeiro semestre de 2004. No total do ano de 2006, a produção de leite deve atingir a marca de 25 bilhões de litros, frente 23,5 bilhões de litros no ano passado (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA, 2006). O aumento na demanda do leite e seus derivados podem estar relacionados há diversos fatores, entre eles o aumento da população, crescimento de renda, redução de preços relativos e de produtos concorrentes ou substitutos, além da mudança nos hábitos alimentares.

O leite e seus derivados apresentam papel fundamental na nutrição humana, é um alimento rico em proteínas, carboidratos, gordura, sais minerais e água. Dados do Ministério da Saúde demonstram que o brasileiro deveria consumir, em média, 200 litros de leite por ano, seja na forma fluída ou na de produtos lácteos. No entanto, o consumo médio no País, é cerca de 120 litros por habitante/ano, está muito aquém do recomendado. O leite é uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, por isso a necessidade de implementações de tecnológicas voltadas à qualidade do leite, com a finalidade de garantir e assegurar a saúde humana merece total atenção dos órgãos de fiscalização do governo (Fagundes, 1980; Zoccal, 2006).

2.2. Antimicrobianos

O surgimento dos antibióticos e antimicrobianos causou uma verdadeira revolução na história da medicina, alterando drasticamente o resultado da luta contra os microrganismos (Bottezini et al., 2002). Existem inúmeras definições utilizadas para o termo antibiótico, alguns autores definem, sob o aspecto farmacológico, como substâncias químicas produzidas por microrganismos (actinomicetos, fungos e

bactérias) ou seus equivalentes sintéticos. Esses antibióticos são capazes de inibir o crescimento (bacteriostático, fungistático, etc) ou destruir (bactericidas, fungicidas) microrganismos causadores de doenças mesmo em pequenas doses (Englert, 1982; BRASIL, 1999; Spinosa et al., 1999).

Em animais de produção, os antimicrobianos têm a função de inibir o crescimento de inúmeros microrganismos, sendo utilizado com finalidades terapêuticas, profiláticas e na maioria dos casos como promotores de crescimento (Anadón e Martinez-Larrañaga, 1999a).

Um fármaco precisa estar presente em concentrações adequadas nos seus locais de ação para produzir seus efeitos característicos. Embora seja obviamente uma função da quantidade da droga administrada, as concentrações séricas atingidas também dependem do grau e da taxa de absorção, distribuição, ligação ou localização nos tecidos, da sua biotransformação e da sua excreção (Benet et al., 1999).

2.2.1. Antimicrobianos na produção animal

Os antimicrobianos mais administrados em produção animal são os beta-lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, sulfas e quinolonas. Atualmente, um número elevado de quinolonas e fluoroquinolonas foram aprovados e disponibilizado comercialmente para uso em animais de produção (Silva, 2004).

Na década de 50 descobriu-se que esses fármacos também podiam atuar como aditivo alimentar, aumentando o crescimento animal e a eficiência produtiva dos mesmos (Mitchell et al., 1998; Fagundes, 2003). A administração dos antimicrobianos nos animais de produção pode ser por via intramuscular,

intravenosa, subcutânea, oral (na alimentação ou água), tópica (pele ou couro) ou ainda por infusões intramamárias ou intrauterinas, o que independentemente da via de administração poderão ocorrer resíduos antimicrobianos nos produtos de origem animal como carne, ovos e leite (Mitchell et al., 1998).

Os medicamentos veterinários estão sendo usados em grande escala devido às práticas agrícolas modernas. A maioria destes medicamentos são administrados como aditivos em ração ou na água de beber para prevenir patologias ou melhorar o crescimento dos animais além de atuarem como agentes terapêuticos (Aerts et al., 1995).

No caso de aves, os antimicrobianos atuam no intestino selecionando a microflora intestinal, eliminando microrganismos produtores de toxinas responsáveis pela baixa absorção dos alimentos pelas aves, ou seja, esses compostos têm a capacidade de deprimir a microbiota intestinal, mantendo-a em níveis mínimos, facilitando assim a digestão enzimática, e como consequência ocorre um aumento da absorção dos nutrientes pelas aves (Flemming, 2005; Englert, 1982; Padilha, 2000).

Os antimicrobianos são também administrados com grande frequência em vacas lactantes, geralmente quando esses animais são portadores de mastite, que nada mais é do que um processo inflamatório das glândulas mamárias responsáveis por causar grandes prejuízos econômicos aos produtores, necessitando de um grande controle bem como de uma antibioticoterapia adequada para sanar esse problema tão comum nos rebanhos. Geralmente são utilizados antimicrobianos em infusões mamárias para conter o processo infeccioso, com a finalidade de concentrar o fármaco na região, porém esse método de aplicação é o principal responsável pelo aparecimento de resíduos antimicrobianos no leite. Além disso,

não podemos de deixar de levar em conta que alguns produtores não respeitam o período de carência dos produtos utilizados, tornando-se importantíssimo à detecção desses medicamentos no leite e carne desses animais tratados.

A presença de resíduos de antibióticos representa o principal ponto crítico de controle de contaminação química do leite, devendo ser monitorada na recepção da matéria prima e constituindo um risco potencial a saúde do consumidor. Esta contaminação pode ocorrer através de fontes diretas e indiretas. Indiretamente em consequência do tratamento veterinário do gado leiteiro, principalmente pelo uso profilático ou terapêutico na mastite ou pelo fornecimento aos rebanhos de dietas suplementares e, diretamente, por adulteração fraudulenta realizada com o objetivo de prolongar a vida útil do leite (Mello Filho et al., 1969; BRASIL, 1993; FAO, 1996).

As utilizações dos antimicrobianos em animais de produção sempre acompanharam a evolução dos fármacos bem como seu uso na medicina humana. Atualmente no Brasil, 14 antimicrobianos são empregados como aditivos em ração animal, mas existem cerca de 120 medicamentos usados na medicina veterinária que contêm antimicrobianos em sua formulação (Palermo-Neto, 2001). Quase todas as rações empregadas para uso avícola possuem 2, 4, 10 ou 40 g/ton de algum tipo de antimicrobiano, conforme suas especificações, para estimular o crescimento e melhorar a conversão alimentar (Englert, 1982). Kolar et al., (2002) analisando o efeito de 23 antibióticos empregados na indústria avícola, reportaram que 128 cepas de *Echerichia Coli* e 88 cepas de *Staphylococcus ssp.* mostraram-se resistentes a 21 dos 23 antibióticos, sendo que 223 cepas de *Enterococcus* mostraram-se resistentes a 13 antibióticos testados.

A presença desses resíduos nos produtos de origem animal está relacionada, principalmente pela falta de consciência dos produtores rurais que não

seguem as boas práticas veterinárias, tais como: uso inadequado do medicamento à espécie que se destina; aumento da dose recomendada e da administração da droga além do uso por via de administração diferente ao indicado. Outro fato de grande importância está relacionado com tempo limite de carência que cada antimicrobiano possui, ou seja, o produtor tem que respeitar o intervalo de tempo entre a última administração do fármaco com a sua eliminação total, bem como todos os seus resíduos até atingir níveis adequados e seguros para o consumo humano. Em 2003, o Brasil apareceu em 39 notificações quanto à presença de metabólitos de nitrofuranos, levando a comunidade europeia a aplicar sanções contra a carne de frango brasileira de modo que 100% dos contêineres passaram a serem testados antes de entrar em território europeu (Granja, 2006).

2.2.2. Quinolonas e Fluoroquinolonas

Desde 1963, a data da primeira síntese da quinolona, poucas dezenas de quinolonas foram sintetizadas. O seu desenvolvimento teve início com o ácido nalidíxico, que apresenta atividade antibacteriana apenas contra as enterobactérias e, como não alcança concentração adequada na maioria dos tecidos e órgãos, sua indicação passou a ser restrita ao tratamento de infecções urinárias não complicadas em humanos (Sader, 1999).

Devido a esse limite, começaram a sintetizar novas drogas antibacterianas ou antimicrobianas dessa mesma família, porém com melhor espectro de atuação, passando a ser denominadas fluoroquinolonas. As diferenças entre quinolonas e fluoroquinolonas estão bem definidas quanto a sua estrutura. As quinolonas apresentam um anel benzênico com um radical carboxílico na posição 3,

enquanto que as fluoroquinolonas apresentam um átomo de flúor na posição 6 e outras drogas mais recentes dessa mesma família apresentam um radical piperazinila na posição 7 (Samanidou et al., 2005) (Figura 1).

CONGÊNERE	R ₁	R ₆	R ₇	X
Ácido nalidíxico	—C ₂ H ₅	—H	—CH ₃	—N—
Cinoxacina*	—C ₂ H ₅	(Fusão do anel dióxolo) [†]		—CH—
Norfloxacina	—C ₂ H ₅	—F		—CH—
Ciprofloxacina		—F		—CH—
Ofloxacina		—F		—CH—
Esparfloxacina [‡]		—F		
Lomefloxacina	—C ₂ H ₅	—F		
Floroxacina	—CH ₂ —CH ₂ —F	—F		
Pefloxacina	—C ₂ H ₅	—F		—CH—
Aminofloxacina	—NHCH ₃	—F		—CH—

* N substitui C-2 na estrutura de anel básico da cinoxacina.

[†]

[‡] Um grupo —NH₂ liga-se ao C-5 na estrutura de anel básico da esparfloxacina.

Fonte: As bases farmacológicas da terapêutica .9 ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil

Figura 1. Estrutura química das quinolonas e fluoroquinolonas.

Dentre as quinolonas e fluoroquinolonas utilizadas na medicina veterinária, existem atualmente quatro gerações diferentes, que podem ser classificadas em dois grupos químicos distintos. O primeiro grupo inclui as quinolonas denominadas ácidos peridonecarboxílicos que são os ácidos oxalínico e nalidíxico e as flumequinas, sendo antagonistas às bactérias Gram-negativas. O ácido pipemínico foi à primeira quinolona a apresentar alguma atividade contra as bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa*. O segundo grupo inclui as fluoroquinolonas denominadas: ciprofloxacina, difloxacina, danofloxacina, enofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina e marbofloxacina, possuindo grande atividade antimicrobiana contra a maioria das bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2000; Martinez et al., 2006).

As fluoroquinolonas muitas vezes têm atividade antibactericida significativa em baixas concentrações. Como por exemplo, a concentração mínima inibitória (CMI) para enrofloxacina e ciprofloxacina, antagonistas a muitos patógenos comuns em medicina veterinária, estão entre a faixa de 0.01-0.5 µg/ml para *Escherichia coli*; 0.03 - 0.5 µg/ml para *Klebsiella spp*; 0.003 - 0.5 µg/ml para *Salmonella spp*; 0.25 – 2 µg/ml para *Pseudomonas aeruginosa*; 0.008 - 0.12 µg/ml para *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*; 0.03 – 1 µg/ml para *Staphylococcus aureus*; 0.06 – 4.0 µg/ml para *Streptococcus spp.* e 0.01 – 1.0 µg/ml para *Mycoplasma spp.* (The Merck Veterinary Manual, 2006; Rao et al., 2002).

As quinolonas e seus derivados geralmente são bem absorvidos no local de administração e no trato digestório. A biotransformação e excreção diferem entre os seus derivados, mas eles podem ser eficientemente biotransformados e excretados pelas vias hepática ou renal (Johnston et al., 2002). Existem exceções

desses fármacos, onde sua eliminação é essencialmente realizada pelos rins, como por exemplo, a ofloxacin, a lomefloxacin (70-80%), a fleroxacin (50-60%), a enoxacin (40%), a norfloxacin (30%) e a ciprofloxacin (30-40%).

Os organismos susceptíveis a ação bactericida das fluoroquinolonas perdem sua viabilidade dentro de 20 minutos quando expostos a concentrações ótimas do fármaco. O efeito de atuação das quinolonas geralmente se mantém por um período de 4-8 horas, e as concentrações ideais giram em torno de 0,1-1,0 µg/ml. Essa eficácia tende a diminuir quando se usam concentrações acima das ideais, onde este efeito bifásico incomum é devido a supressão da síntese do RNA (The Merck Veterinary Manual, 2006).

2.2.3. Mecanismo de ação

As fluoroquinolonas atuam inibindo especificamente a subunidade A da enzima procariótica DNA-girase. Os dois filamentos do DNA bacteriano da dupla hélice devem ser separados para permitir a replicação ou a transcrição do DNA. Todavia, qualquer fator capaz de separar os filamentos resulta em “super-helicoidização” ou um superespiral positivo excessivo do DNA frente ao ponto de separação. Para combater este obstáculo mecânico, a enzima bacteriana DNA-girase atua durante os processos de replicação e transcrição do DNA bacteriano, sendo responsável pela introdução contínua de superespirais negativos no DNA. Trata-se de uma reação ATP dependente que requer a ruptura de ambos os filamentos de DNA para permitir a passagem de um segmento de DNA através dessa ruptura, que posteriormente será selada (Leonardo e Castro-Prado, 2001; Martinez et al., 2006).

Os fármacos pertencentes a família das fluoroquinolonas, geralmente inibem a “super-helicoidização” do DNA, mediado pela girase em concentrações que estão bem correlacionadas com as necessárias para inibir o crescimento bacteriano (0,1 a 1,0 µg/ml) (The Merck Veterinary Manual, 2006).

Todas as quinolonas agem por inibição na atividade da enzima alvo, uma topoisomerase tipo II, responsável primariamente pela introdução da super-helicoidização do DNA na presença de ATP; essas alterações do DNA desempenham funções nos processos de replicação, transcrição, recombinação e reparação celular (Takenouchi et al., 1995, Zhanel et al., 1995; Mandell e Petri Jr, 1999). As células eucarióticas não contêm DNA-girase, porém possui DNA-topoisomerase tipo II que remove mecanicamente os superespirais positivos do DNA eucariótico, a fim de evitar seu entrelaçamento durante a replicação. As quinolonas só inibem a topoisomerase tipo II de células eucarióticas em concentrações elevadas (100 – 1000 µg/ml) para impedir o crescimento bacteriano (Mandell e Petri Jr, 1999).

2.2.4. Propriedades físicos-químicas

A origem das fluoroquinolonas está intrinsecamente relacionada com a das quinolonas. O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona a apresentar atividade antibacteriana sendo sintetizada e patenteada por Lescher et al., (1962).

Depois da descoberta dos efeitos terapêuticos do ácido nalidíxico, os químicos começaram a sondar cada posição dentro do núcleo dessa quinolona em uma tentativa de melhorar o potencial da atividade anti-bacteriana e reduzir os efeitos colaterais. Muitos compostos foram sintetizados, porém estudos demonstraram que existem quatro componentes no núcleo da 4-quinolona que,

quando manipulados, podem realçar a atividade antibacteriana desse fármaco (Martinez et al., 2006).

O primeiro composto surgiu com a inclusão de 1 átomo de flúor na posição C-6 dando origem a flumequina, patenteada em 1973, a qual apresentou importantes indicações de que esta classe poderia ser utilizada no combate a infecções bacterianas (Bayer, 1995).

A inclusão de um átomo de flúor nas quinolonas de primeira geração aumentou as propriedades dos fármacos contra bactérias Gram-positivas como os *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Clostridium* (Roybol et al., 1997). No entanto, o grande avanço da quimioterapia antibacteriana das quinolonas ocorreu no final da década de 1970, quando a introdução de um átomo de flúor na posição C-6 e um grupo piperazinila na posição C-7, conferiram um amplo e potente espectro de atividade antimicrobiana, obtendo-se, assim, a norfloxacin, patenteada em 1978, sendo a primeira fluoroquinolona a apresentar potente atividade bacteriana (Wright et al., 2000). A inclusão do grupo piperazinila melhorou a eficácia contra microrganismos Gram negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis* (Roybol et al., 2002), essas modificações resultaram também em melhorias significativas na biotransformação oral desses fármacos (Martinez et al., 2006; Appelbaum e Hunter, 2000).

Após a descoberta da atividade antibacteriana da norfloxacin, inúmeros análogos foram sintetizados nos últimos 35 anos, identificando-se assim, posições e grupos farmacofóricos e toxicofóricos (Appelbaum e Hunter, 2000).

Várias outras substituições, tais como a inclusão do grupo etil na posição N-1, melhoraram ainda mais essa atividade. Outros exemplos das modificações na

posição N-1 incluem o grupo do ciclopropil encontrado na ciprofloxacina e enrofloxacin, além do anel fenil da difloxacina (Martinez et al., 2006).

Várias substituições têm sido realizadas em diferentes posições do anel quinolônico, no entanto, as posições críticas para a atividade biológica são a C-6 (contendo um átomo de flúor), C-7 (contendo grupos piperazinila e pirrolidinila) e N-1 (contendo grupos etilas, ciclopropil, ter-butila e arilas fluoradas). Existem também algumas fluoroquinolonas que possuem modificações em posições C-5 e/ou C-8 com potente atividade antibactericida como, por exemplo, BMY-40062, a perfloxacina, a fleroxacin e a sparfloxacina (Martinez et al., 2006).

Por causa de sua estrutura química as fluoroquinolonas, com poucas exceções, exibem solubilidade baixa em água entre o pH 6 e 8. Em valores de pH entre o pKa1 e o pKa2, estes zwitterions têm uma carga neutra líquida, podendo livremente se difundir através das membranas biológicas.

2.3. Resistência antimicrobiana

O aparecimento e a dispersão das bactérias resistentes ocasionam obstáculos aos procedimentos clínicos e aumentam os custos do tratamento e as taxas de morbidade e mortalidade na população humana (Padilha, 2000).

A resistência ocorre quando as bactérias desenvolvem um mecanismo de sobrevivência ao uso do promotor de crescimento ou antimicrobiano, sendo esse fato de forma geral, associados ao uso de dosagem sub-terapêuticas de forma contínua e por longos períodos de tempo (Flemming, 2005). Este tipo de resistência foi descrito por Edens (2003) da seguinte forma:

I) decorrente do aumento da resistência á absorção do antibiótico pela parede celular, anulando parcial ou total o seu efeito;

II) aumento do metabolismo do antibiótico com sua transformação em produto não lesivo ás bactérias;

III) transformação em metabólitos alternativos que permitem aos microrganismos uma coexistência com a droga.

Os meios de resistência são vários e sempre há novas descobertas. A resistência é em geral passada de uma bactéria para outra por 3 formas:

I) mutação nos cromossomos durante a divisão celular (bactéria se torna apta a utilizar o DNA do meio);

II) mutação de um gene ou múltiplos genes selecionados e

III) o mecanismo de resistência extra-cromossômica em que uma estrutura citoplasmática inteira (plasmídeo) é permutada.

O desenvolvimento de resistência bacteriana em humanos devido à utilização do grupo das quinolonas e fluoroquinolonas na agropecuária tem sido alvo de diversos trabalhos de pesquisa (Garau et al., 1999; Malorny et al., 1999; Smith et al., 1999), servindo como alerta para a necessidade de um controle global do seu uso e melhoria da saúde pública (Anadón e Larrañaga, 1999b).

De acordo com a World Health Organization – WHO (2001), entre os fatores responsabilizados pela disseminação do fenômeno da resistência bacteriana está o uso indiscriminado de antibióticos, tanto em medicina humana quanto veterinária. Apesar disso, este fenômeno é passível de controle, principalmente, através do desenvolvimento de programas de vigilância epidemiológica em saúde humana e animal. Sendo a detecção de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal, entre eles o leite, uma medida básica a ser adotada.

Estudos de Garau et al., (1999), realizados na Espanha, detectaram o aparecimento de bactérias *Escherichia coli* resistentes as quinolonas, provenientes de carnes suínas e aves, reforçando ainda mais a necessidade de controle do uso indiscriminado desses antibióticos.

Nos últimos anos, a ocorrência de bactérias resistentes aos principais compostos antimicrobianos tem crescido, havendo inclusive o relato de casos isolados com resistências múltiplas (FOOD BORNE, 1999; Heurtin et al., 1999; Lambie et al., 2000). Nesse caso de resistência múltipla, o DNA é incorporado no citoplasma da bactéria receptora na forma de um plasmídeo, que é capaz de replicar mecanismos de resistência independente do cromossomo do hospedeiro (Santos et al., 2005; Flemming, 2005).

Farias et al., (1997) avaliaram a sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* oxalina-suceptíveis e oxalina-resistentes a agentes antimicrobianos comumente utilizados em infecções causadas por esses patógenos. Foram isoladas 114 cepas de vários hospitais de Campinas, São Paulo e João Pessoa e como resultados, obtiveram a concentração mínima inibitória (CMI) para 24 agentes antimicrobianos, dentre eles as fluoroquinolonas, demonstrando uma alta resistência entre as cepas de *S. aureus* obtidos em hospitais brasileiros.

O uso de enrofloxacin em bovinos também levou ao aparecimento de cepas de *Salmonella* serotipo *typhimurium* resistentes, que vêm causando problemas no tratamento de salmoneloses em crianças na Alemanha (Malorny et al., 1999). Pessanha e Gontijo Filho (2001) utilizaram antimicrobianos como promotores de crescimento e chegaram à conclusão que os frangos de corte podem funcionar como verdadeiros reservatórios de genes de resistência a antibióticos importantes empregados na medicina veterinária.

Outros autores ainda identificaram microrganismos resistentes a neomicina, penicilina, gentamicina, bacitracina, entre outros, em amostras de cama de frango, que eram posteriormente reutilizadas como adubo orgânico em solos destinados ao cultivo. Nesta cama, foram isolados diversos microrganismos patogênicos ao homem, como *Aeromonas hydrophila*, *Yersina enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e coliformes fecais (Kelley et al., 1998).

2.4. Efeitos prejudiciais dos resíduos antimicrobianos em humanos

Os resíduos antimicrobianos nos produtos de origem animal causam efeitos adversos prejudiciais no organismo humano, tais como: altera a flora natural bacteriana, efeitos tóxicos diversos e interferência no funcionamento normal do sistema imunológico dos indivíduos além das reações alérgicas freqüentemente relatadas.

A colonização resistente da microflora intestinal é por meio da sua defesa natural contra a colonização e translocação de patógenos, que conseqüentemente são contra uma grande quantidade desses patógenos oportunistas (Myllyniemi, 2004). A administração dos agentes antimicrobianos sem restrições podem causar uma disfunção nessa defesa natural, por isso é necessário conhecer o espectro desse agente, bem como a dose recomendada, a farmacocinética e sua farmacodinâmica (Sullivan et al., 2001). Estudos realizados por Brumfitt et al., (1984) com a finalidade de estudar a farmacocinética da ciprofloxacina na flora fecal de 12 indivíduos saudáveis na faixa etária de 19 a 40 anos, foram submetidos a administração oral de 500mg da ciprofloxacina em intervalos de 8 h por um período de 7 dias. Após a primeira e a última dose, o sangue e amostras de urina foram

colhidos para posteriores exames, onde as concentrações da droga foram determinadas por bioensaios. Os resultados indicaram um acúmulo significativo da droga no soro nos dias 1 ao 7, os picos médios entre 1 a 2 h após a administração do fármaco foram de 1,9 e 2,8 µg/ml, respectivamente e, aproximadamente 40 % da droga foi excretada na urina durante o período de 12 h. Quantidades consideráveis de ciprofloxacina foram encontradas nas fezes no sétimo dia (185 a 2.220 µg/g). Esse acúmulo nas fezes fez com que a flora fecal aeróbia fosse alterada, pois os exames comprovaram a ausência de *Coliformes fecais* nesse dia, além de significativa redução nas concentrações de *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Os organismos anaeróbios presentes foram afetados pouco quantitativamente, porém criaram resistência a ciprofloxacina. Em 1 semana após o término do estudo, a flora fecal tinha retornado ao estado similar àquele encontrado antes do tratamento.

A hipersensibilidade da droga é definida como a resposta imuno-imediata com o agente que sensibiliza o paciente, a reação alérgica a droga é restrita a reação medida pela IgE (Riedl e Casillas, 2003). As reações imunológicas induzidas pelas drogas podem ser cutânea, subcutânea ou mesmo ter uma resposta latente (Mylliemi, 2004), podendo ser classificadas em 4 tipos:

- I) choque anafilático, asma e edema;
- II) anemia hemolítica e granulócita;
- III) doença do soro e alergia vascular; ou
- IV) dermatites alérgicas (Dyam, 1993; Riedl e Casillas, 2003).

Muitas vezes essas reações adversas às drogas podem estar associadas não somente à ingestão desses fármacos por prescrição médica, como também por ingestão de resíduos das drogas presente em alimentos de origem animal.

Os possíveis efeitos da toxicidade das fluoroquinolonas e quinolonas atingem principalmente o fígado, olhos, além de alterar o potencial mutagênico/carcinogênico. A ciprofloxacina assim como a cinoxacina e a norfloxacina têm algum efeito em determinados parâmetros usados para avaliar a integridade dos rins, entretanto não é uma substância nefrotóxica preliminar. Em doses elevadas seu efeito na função renal é relacionado a uma reação do corpo causada por cristais da droga. Determinadas quinolonas são conhecidas por causar cataratas em animais, mas inúmeros estudos avaliaram esse efeito da ciprofloxacina em animais e humanos e concluíram que ela não causa catarata em humanos (Bayer, 1999).

A toxicidade das fluoroquinolonas em humanos é baixa devido ao fato que a enzima análoga ao DNA – girase bacteriano em células eucarióticas é de 100 a 1000 vezes mais susceptível de que os inibidores de girase. Por isso as fluoroquinolonas são tão largamente utilizadas em medicina humana e veterinária (Bayer, 1999).

2.5. Limite máximo de resíduos (LMRs)

As quantidades de resíduos presentes nos alimentos, consideradas seguras para o consumo humano, dependem de estudos toxicológicos. Na prática são estabelecidos os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) que geralmente são harmonizados internacionalmente ou criados pelo próprio país por meio de estudos do tempo de aplicação do fármaco e a presença de metabólitos nos produtos de origem animal (Flemming, 2004).

De acordo com o Concil Regulation 2377/90 (EEC, 1990), a medida do LMR e sua máxima concentração deve servir como parametrizador da utilização de produtos veterinários em animais de corte/criação. Essa medida é denominada como a fração máxima da droga legalmente permitida como residual na matéria prima ou em produtos derivados dos animais tratados com fármacos (*Codex Alimentarius*, 1997). As ponderações para a determinação do LMR são baseadas no tipo e quantidade de resíduos, considerando o período toxicológico para a saúde humana com base na dose diária aceitável (IDA), criando-se um fator de segurança alimentar (Brito, 2003). Em outras palavras, existem metodologias científicas que permitem verificar qual o risco associado à ingestão de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Assim, se os níveis de resíduos de um antibiótico encontrados em alimentos de origem animal estiverem abaixo daqueles fixados pelo *Codex Alimentarius* da FAO/OMS como Limites Máximos de Resíduos (LMR), nenhum perigo representaria para a saúde do consumidor (Palermo – Neto, 2004). O Brasil adotou os índices de LMR harmonizados no Mercosul ou os recomendados pelos órgãos internacionais *Codex Alimentarius* e pela Comunidade Européia, a Tabela 1 descreve os LMRs considerados seguros para o consumo humano estabelecido pelo Concil Regulation nº 2377/90 da soma da ciprofloxacina com a enrofloxacin em produtos animais.

A IDA é a quantidade de um agente químico presente no alimento que pode ser ingerido através da dieta, diariamente, durante toda a vida do indivíduo, sem provocar riscos de intoxicação para os seres humanos (Myllyniemi, 2004; ECC, 2001). Também é determinado o intervalo de tempo que deve existir entre a ingestão para que os resíduos decaiam atingindo os níveis de tolerância, esse intervalo é denominado de período de carência (Myllyniemi, 2004; Nouws et al., 1984).

O período de carência é determinado através de análises farmacocinéticas específicas para cada medicamento (Mitchell et al., 1998). Fica sob responsabilidade da indústria produtora dos antimicrobianos o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação dos resíduos e cabe a Food and Drug Administration (FDA) aprovar ou não tais métodos (Kiser, 1984).

Soma da enrofloxacin com a ciprofloxacina	Todos os alimentos produzidos pelas espécies animais, exceto de bovinos, caprinos, suínos, coelhos e aves domésticas	100 µg/kg músculo
		100 µg/kg gordura
		200 µg/kg fígado
		200 µg/kg rim
	Bovinos, ovinos e caprinos	100 µg/kg músculo
		100 µg/kg gordura
		300 µg/kg fígado
		200 µg/kg rim
	Suínos e coelhos	100 µg/kg leite
		100 µg/kg músculo
		100 µg/kg gordura
		200 µg/kg fígado
	Aves domésticas*	300 µg/kg rim
		100 µg/kg músculo
		100 µg/kg gordura
		200 µg/kg fígado
		300 µg/kg rim

* Não é permitido o uso nos animais em que os ovos são produzidos para o consumo humano.

Fonte: Unofficial Consolidates version of the Annexes I to IV of Council Regulation nº 2377/90. Updated up to 12/10/2005.

Tabela 1. Limites Máximos de Resíduos (LMRs) considerados seguros para o consumo humano da soma da ciprofloxacina com a enroloxacina estabelecido pelo Concil Regulation nº 2377/90.

O tempo de carência sugerido em alguns antimicrobianos de diversas procedências utilizados em vacas leiteiras com mastite, por exemplo, gira em torno de 3 a 5 dias para o leite poder ser consumido. Para frangos esse tempo fica em torno de 7 a 10 dias, suínos perto dos 10 dias e carne entre 7 a 28 dias, essa variação está relacionada conforme o fármaco e a atividade bacteriana do produto ministrado. Para Raia (2001) essas informações fornecidas pelos fabricantes desses antimicrobianos, muitas vezes não garantem que estamos consumindo produtos de origem animal isento desses resíduos. Por isso há necessidade de estabelecer normas rígidas no combate e fiscalização desses resíduos bem como orientar os produtores e médicos veterinários desses períodos de carência com a finalidade de evitar os resíduos nos alimentos.

2.6. Monitoramento dos resíduos antimicrobianos

Evidências crescentes revelam o impacto de resistência às drogas em saúde humana. Devido à amplitude e à frequência dessas resistências, elas passaram a ser tratadas como questão emergente e significativa para a saúde pública, tendo recebido atenção de organizações que tratam deste aspecto, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) e o *Codex Alimentarius* (Padilha, 2000). Em 1997, a OMS recomendou que antimicrobianos normalmente prescritos para humanos fossem proibidos como promotores de crescimento em animais.

Na Europa, a Suécia e a Dinamarca foram os primeiros países a estabelecerem programas de controle de uso de antibióticos na produção animal. Em 1986, a Suécia eliminou o uso destes compostos como promotores de crescimento, direcionando o seu uso apenas para a terapia de animais enfermos, e

passou a requerer prescrição veterinária para seu uso (Padilha, 2000). Em discussão sobre resistência dos microrganismos com implicações na saúde pública, Anadón e Larrañaga (1999) atentam para a legislação europeia sobre os riscos de não se fazer um monitoramento eficiente do uso de diversos antibióticos.

Discussões recentes nos Estados Unidos e no Canadá abordaram a provável associação entre o uso de antibióticos na produção animal e a rápida disseminação de bactérias resistentes na população humana. Estas discussões evidenciaram a necessidade do estabelecimento de programas de controle, visando promover a redução e/ou o uso adequado desses compostos nas criações animais destinadas ao consumo humano (Padilha, 2000).

Nos Estados Unidos, o "Programa Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana" teve início em 1996, através do trabalho conjunto do Center for Disease Control and Prevention, do FDA e do Departamento de Agricultura. O programa monitora as modificações de susceptibilidade antimicrobiana de patógenos entéricos zoonóticos em espécies humanas e animais (enfermos e saudáveis). Em janeiro de 1999, o FDA aprovou um regulamento que eliminou a maioria dos antibióticos usados como promotores de crescimento (Padilha, 2000).

O Centro de Medicina Veterinária (EUA) em 31/10/2000 propôs a proibição do uso das fluoroquinolonas, enrofloxacin e sarafloxacin, em frangos com a finalidade de evitar a indução de resistência bacteriana em humanos, até o momento apenas a sarafloxacin foi suspensa (Silva, 2004).

No Brasil, o monitoramento da utilização desses antimicrobianos é realizado pelo "Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR", instituído pela Portaria Ministerial n.º 51 e adequado pela Portaria

Ministerial n.º 527. Os produtos de uso veterinário são registrados e fiscalizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), onde a legislação que estabelece os LMRs encontra-se na Normativa SDA/MAPA n.º 42/1999 (BRASIL, 1999).

Através da Portaria nº 193 da SDA/MAPA ficam proibidos a utilização com fins de promotores de crescimento os seguintes antimicrobianos: penicilina, clortetraciclina e oxitetraciclina (BRASIL, 1998a). Conforme Portaria nº 448 da SDA/MAPA, foram proibidos a fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana (BRASIL, 1998b).

No intuito de avaliar e prevenir estes riscos, o Ministério da Saúde implantou no Brasil, em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMvet). Na implantação do Programa Nacional elegeu-se o leite como primeiro alimento a ser pesquisado, com base nos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que menciona o leite como sendo a proteína de origem animal mais consumida pela população brasileira. Definiu-se também que, os seguintes princípios ativos deveriam ser pesquisados: tetraciclina, β -lactâmicos, sulfas, abamectina, doramectina e ivermectina (BRASIL, 2001b).

Para avaliar estes riscos no Estado do Paraná, a Secretaria de Estado da Saúde (SESA) promulgou a Resolução Nº 337/03, criando o Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet-Pr). O Programa estrutura-se com a instituição de um Grupo Técnico Científico – GTC, capaz de gerar informações e conhecimentos necessários para a formulação de políticas públicas de saúde que visem a melhoria das

condições de produção de alimentos de origem animal, com a minimização e/ou eliminação de riscos à saúde da população. (BRASIL, 2003a; BRASIL 2003b).

Como fase inicial do PAMvet-Pr realizou-se levantamento sobre os medicamentos veterinários utilizados nas principais patologias do rebanho leiteiro do Estado. Os resultados evidenciaram que os antimicrobianos (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina) e os antiparasitários (avermectinas, piretróides, organofosforados) foram os grupos de maior uso nesses animais (Pontes-Netto et al., 2005).

Apesar de haver uma forte tendência na intenção de banir a utilização desses compostos antimicrobianos na produção animal como promotores de crescimento, o seu uso para fins terapêuticos deve continuar, visto que epidemias podem disseminar rapidamente em uma criação, provocando um aumento na mortalidade bem como prejuízos enormes aos produtores rurais. Todavia, o uso desses antimicrobianos em animais requerem informações detalhadas sobre sua farmacocinética, o limite de carência além de sua biotransformação, incluindo análises desses resíduos nos produtos de origem animal (Silva, 2004).

2.7. Métodos de análise residual

A utilização de modernas tecnologias implica em uma dependência cada vez maior do uso de substâncias químicas em animais de criação, como uso de agroquímicos incluindo inseticidas, herbicidas e drogas de uso veterinário. Por um lado, estas substâncias contribuem para o aumento da produtividade, mas por outro lado podem gerar resíduos que necessitam serem monitorados (Heitzman, 1993).

Obviamente, a disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar os produtos de origem animal, quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários, é essencial. No entanto, segundo a Comunidade Européia (EU), há mais de 3000 formulações comerciais contendo cerca de 200 substâncias ativas diferentes, o que dificulta o monitoramento de todos os fármacos nos diversos tipos de alimentos (Aerts, 1995).

Tradicionalmente, a análise desses resíduos é baseada em métodos analíticos como cromatografia líquida ou gasosa e espectrometria de massa, gerando cromatogramas de interpretação complexa. O uso de imunoenaios apresenta-se como uma alternativa (Watanabe et al., 1998; Severo, 1999) considerando a qualidade do método, baixo tempo de execução e custo, repetibilidade em um grande número de amostras que podem ser analisadas (Beier e Stanker, 1996).

Os métodos imunoquímicos baseiam-se na habilidade dos anticorpos em se ligarem especificamente com diferentes substâncias. Essas associações entre anticorpos e antígenos correspondentes são denominadas reações imunológicas (Myllyniemi, 2004).

Os métodos imunológicos surgiram na década de 50, quando Yalow e Berson (1959) descreveram o primeiro radioimunoensaio para detectar insulina humana, rendendo a Rosalyn Yalow o Prêmio Nobel em 1977. A partir de então, as técnicas imunoquímicas foram desenvolvidas como métodos de análise de macromoléculas (enzimas, hormônios), e, posteriormente, para moléculas orgânicas pequenas (drogas, fármacos) (Nunes, 2005). Devido à sua alta especificidade, anticorpos vêm sendo utilizados para purificar, classificar, identificar e quantificar substâncias (Trione, 1988).

Diversos métodos têm sido propostos para a detecção de resíduos das fluoroquinolonas, um exemplo disso é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com extração em fase sólida, que demonstra boa precisão nos ensaios realizados por Gigoso et al., (2000) em amostras de ovos, rim e músculos de bovinos. Análises de multirresíduos têm sido realizadas para diversos alimentos como carne de frango e peru, ovos, fígado de galinha, mel, carne bovina, suína e leite, com o intuito de detectar o uso demasiado de antibióticos do tipo fluoroquinolonas e ácidos oxalínicos e nalidíxicos (Rose et al., 1998). Os métodos imunológicos costumam ser muito utilizados na detecção e identificação de resíduos antimicrobianos, onde o ELISA é um método bem conhecido para detectar esses resíduos nos produtos de origem animal (Myllyniemi, 2004).

A padronização de um ensaio imunoenzimático é muito laboriosa, pois para que se tenha sucesso nesse trabalho, devem-se levar em conta três etapas fundamentais: a síntese dos haptenos, o preparo dos imunógenos e a imunização em animais de laboratórios. Esses fatores acabam-se tornando a chave para o sucesso quando se visa à produção e a padronização de anticorpos (Nunes, 2005). A utilização de anticorpos monoclonais em comparação aos anticorpos policlonais apresenta algumas vantagens, como a obtenção de grandes quantidades de anticorpos específicos em relação ao antígeno (Koller e Milstein, 1975).

Anticorpos monoclonais foram produzidos por Holtzaple et al., (1997) contra a sarafloxacin e os resultados obtidos demonstraram que os anticorpos monoclonais apresentaram alta afinidade com o fármaco, caracterizando a habilidade do *kit* desenvolvido pelos autores em detectar fluoroquinolonas.

Jin et al., (2006) padronizaram um ELISA competitivo direto e um ensaio imunocromatográfico utilizando anticorpos monoclonais para detectar neomicina no

plasma e leite de animais. Os limites de detecção para o ELISA foram de 6,85 ng/ml em PBS; 3,61 ng/ml no plasma e 2,73 ng/ml no leite, enquanto que o método imunocromatográfico foi de 10 ng/ml respectivamente. Os autores concluíram que mesmo com essas diferenças em relação ao limite de detecção, esses métodos podem ser utilizados como *screening*.

Testando a especificidade e a exatidão do método competitivo indireto do ELISA contra a ciprofloxacina em alimentos de origem animal, Jihua-Duan e Zonghui-Yuan (2001) chegaram à conclusão de que esse método foi sensível para detectar esse antibiótico em suínos (75,58 %), aves (81,29 %) e leite (84,30%) com um coeficiente de variação de 3,7 a 9,2 % sobre a concentração utilizada de ciprofloxacina.

Bucknall et al., (2003) avaliaram dois imunoensaios, um específico e outro genérico, com a finalidade de detectar resíduos de diferentes quinolonas e fluoroquinolonas em produtos de origem animal. A conclusão que esses autores chegaram para o ensaio imunoenzimático genérico foi a capacidade de detectar vários tipos de quinolonas e fluoroquinolonas, onde sua utilização é considerada viável quando se analisa um grande número de amostras, porém ele não é capaz de distinguir quais são os tipos detectados. Isso já não ocorreu com o imunoensaio específico, pois o teste foi capaz de distinguir qual o tipo de resíduo detectado, confirmando assim a necessidade de se estabelecer metodologias específicas para detecção desses resíduos em produtos de origem animal.

Um enzima imunoensaio (ELISA) competitivo direto foi desenvolvido por Huet et al., (2006) com a finalidade de detectar diversas quinolonas e fluoroquinolonas em matrizes animais. A otimização do imunoensaio genérico utilizando anticorpos anti-sarafloxacina quando combinado com a norfloxacina

conjugada a peroxidase, apresentou 50 % de inibição em concentrações de 0,21 ng/ml⁻¹ para a sarafloxacin. A seleção dos antibióticos foi realizada usando uma extração simples e rápida, com uma mistura de metanol e PBS. Esta extração comum foi capaz de detectar 15 resíduos da fluoroquinolonas e quinolonas, tais como a sarafloxacin, norfloxacin, difloxacin, ciprofloxacina, pefloxacin, ofloxacin, cinoxacin, danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, lomefloxacin, enoxacin, flumequina, ácido oxalínico e o ácido nalidíxico em fígado de porco, músculo das aves domésticas, ovos, peixes e camarão. A capacidade de detecção do método desenvolvido para a maioria dos compostos foi < 10 µg/kg⁻¹ exceto para a sarafloxacin, flumequina, ácido oxalínico e cinoxacin nas matrizes testadas.

A análise de resíduo de salinomicina, um antibiótico ionóforo utilizado no controle de coccidiose em rações de aves utilizando ELISA e CLAE, foi relatado por Shimer *et al.*, (1996), onde os autores conseguiram um *kit* baseado em ELISA para monitorar o uso de salinomicina em aves. Comparando-se os resultados entre as metodologias utilizadas, obtiveram uma eficiência de 89,3 e 95,0 % para ELISA e CLAE, respectivamente, relatando a eficiência do kit produzido quando comparado a CLAE.

Samsonova *et al.*,(2005) avaliaram a influência dos imunoreagentes na performance da estrutura do ensaio utilizando um ELISA dos tipos indireto e direto para detectarem resíduos de estreptomicina em amostras de leite. A pesquisa dos imunoreagentes, com diferentes estruturas e propriedades, quando avaliados pelo ELISA direto apresentaram um limite de detecção de 3,0 ng/ml⁻¹ contra 2,5 ng/ml⁻¹ do ELISA indireto. Os autores levaram em conta a sensibilidade, acurácia, além de comparar qual dos dois ensaios foram mais rápidos, chegando à conclusão que o melhor ensaio para detectar estreptomicina no leite foi o ELISA direto, pois esse

ensaio conseguiu demonstrar a melhor performance em relação aos limites avaliados.

Até o presente momento não existe na literatura nacional nenhum dado a respeito da detecção das fluoroquinolonas por ensaio imunoenzimático (ELISA) nos produtos de origem animal, o que torna nossos produtores e indústrias escravos da importação desses *kits* de detecção. Portanto existe uma grande necessidade de desenvolver esse tipo de método com a finalidade de auxiliar esses produtores bem como as indústrias exportadoras de produtos de origem animal, uma vez que muitos países exigem a isenção desses fármacos nesses produtos.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo geral*

Padronização e desenvolvimento de reagentes imunoenzimáticos para pesquisa de ciprofloxacina em produtos de origem animal.

3.2. *Objetivos específicos*

1. Produção, quantificação e caracterização de anticorpos policlonais contra a ciprofloxacina em coelhos da raça Norfolk.
2. Produção e caracterização de conjugados enzimáticos para serem utilizados na pesquisa de resíduos de ciprofloxacina.
3. Avaliar a eficiência dos reagentes imunoenzimáticos produzidos *in house* com o *kit* referência disponível no mercado.

4. Material e métodos

4.1. Animais

Para a obtenção de anticorpos policlonais, foram imunizadas 3 fêmeas de coelho da raça Norfolk, e como grupo controle 2 animais com idade aproximada de 2 meses, com peso corpóreo médio de 2 kg cada animal. Esses animais foram gentilmente doados pelo biotério central da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu (Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu) (UNESP). Durante a fase do experimento realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear da USP (LANA/CENA/USP), os animais foram alocados em gaiolas individuais (60x60x60cm), suspensas do solo no período de 20/01/2005 a 15/03/2005 (Figura 2). A alimentação foi com ração comercial para coelhos (SONUTRI®) *ad libitum*, atendendo às exigências do National Research Council (NRC, 1977), com livre acesso à água.



Figura 2. Coelhos utilizados no experimento mantidos em gaiolas metabólicas.

4.2. Preparo de antígenos para as imunizações

Uma vez que os antibióticos não são imunogênicos, para se obter resposta imune faz-se necessário à conjugação das moléculas a proteínas carreadoras. Moléculas de ciprofloxacina (MP Biomedicals, LLC, Ohio) foram conjugadas a proteína carreadora soro albumina bovina cationizada (cBSA), utilizando um *kit* comercial de conjugação da *PIERCE BIOTECHNOLOGY* (Rockford, U.S.A) conhecido por *Imject® Pharmalink™ Immunogem Kit*. Esse *kit* utilizado para a conjugação é composto pelos seguintes reagentes: *Imject SuperCarrier® Immune Modulator* (BSA cationized – 10 x 2 mg liofilizado); *PharmaLink™ Conjugation Buffer* (Tampão MES 0,1 M [2-ácido 2-(N-morfolina)]-etanosulfônico, pH 4,7 30 ml), 0.15 M NaCl; pH 4,7); *PharmaLink™ Coupling Reagent* (4 ml de formaldeído 37%); *PharmaLink™ Purification Buffer Salts* (tampão fosfato de sódio 0,06 M, 6 ml 10 vezes concentrado); *Imject® Alum* (50 ml de adjuvante) e *D – Salt™ Dextran Plastic Desalting columns* (colunas de purificação, 10 X 5 ml).

A imunogenicidade dos antígenos aumenta quando se utilizam compostos cationizados (PIERCE, 2006). Os antígenos cationizados ligam-se com maior afinidade as superfícies intracelulares, se tornando capazes de serem processados e internalizado com maior rapidez. A PIERCE BIOTHECNOLOGY (Rockford, U.S.A) desenvolveu e otimizou o BSA cationizado (cBSA), denominado *Imject SuperCarrier® Immune Modulator* que tem a função de modificar os grupos carboxílicos das proteínas para que elas tenham um ponto isoelétrico (pI) básico. As propriedades imunogênicas realçadas com o cBSA são dadas as moléculas ligadas covalentemente a sua estrutura. Esse imuno modulador produz uma resposta maior do que os moduladores de resposta imune geralmente utilizados, além disso, a

cBSA é uma proteína de maior robustez disponível para reações de modificações e conjugação de moléculas (PIERCE, 2006).

Para se conjugar covalentemente um antibiótico a uma proteína carreadora, é necessário que o mesmo disponha de grupamentos funcionais susceptíveis de serem utilizados para esse fim, tais como grupamento amino ($-\text{NH}_2$), carboxila ($-\text{COOH}$), hidroxila ($-\text{OH}$) ou sulfidril ($-\text{SH}$) (Nunes, 2005).

A ciprofloxacina possui um grupamento amino na posição 7, o que lhe confere a característica ideal para que possa ser conjugada covalentemente ao cBSA. Inicialmente, essa reação ocorre com a condensação do formaldeído (*PharmaLink™ Coupling Reagent*) com o grupo amino presente na ciprofloxacina, cujo fenômeno é denominado reação de Mannich.

Primeiramente, o *SuperCarrier® Immune Protein* (cBSA 2 mg) foi reconstituído com 200 µl de água MilliQ. Separadamente, foram pipetados 200 µl da solução de ciprofloxacina (10 mg/ml) diluída em metanol (MERCK) em um tubo tipo *Eppendorf*, juntamente com 200 µl do *PharmaLink® Conjugation Buffer*. No frasco em que o cBSA foi reconstituído, adicionou-se 200 µl da mistura da solução de ciprofloxacina com o *PharmaLink® Conjugation Buffer*, juntamente com 50 µl do *PharmaLink™ Coupling Reagent*, incubado por 24 h a temperatura constante de 40° C.

Após o término dessa incubação, o produto foi purificado em colunas *D – Salt™ Dextran Plastic Desalting columns*. Primeiramente a coluna foi equilibrada com 5 ml *PharmaLink™ Purification Buffer Salts*, logo em seguida o conjugado incubado foi aplicando na coluna e amostras contendo 0,5 ml foram recolhidas em tubos tipo *Eppendorf*, até obtermos 8 ml de eluato. Ao término desse processo, foi feita a leitura dos eluatos em espectrofotômetro (Perkin Elmer, lâmbda EZ 150 UV/VIS) a

280 nm. As frações 4 a 6 foram as que apresentaram maiores quantidades de haptenos ligados à proteína carreadora.

4.3. Protocolo de imunizações

4.3.1. Preparação do imunógeno com o adjuvante

O adjuvante Imject[®] Alum é uma alternativa eficaz e mais conveniente do que os adjuvantes de Freund. Esse adjuvante quando associado ao uso do *SuperCarrier®Immune Modulator* (cBSA) apresenta uma resposta imune realçada, sem ocasionar reações nos animais imunizados, diferentemente do que geralmente ocorre com os adjuvantes de Freund.

O preparo é simples, primeiramente o imunógeno foi diluído em volume igual ao do adjuvante Imject[®] Alum, na concentração de 330-500 µg/ml do cBSA conjugado com a ciprofloxacina. Segundo o protocolo, para o sucesso das imunizações em coelho, utilizamos 200 µl do *pool* das frações 4 a 6 juntamente com 200 µl do adjuvante, completando-se para um volume final de 500 µl com soro fisiológico. Essa mistura foi realizada em tubos tipo *Eppendorf* que ficaram sob agitação durante 30 minutos antes das imunizações.

4.3.2. Ciclo das imunizações

Antes do início do ciclo de imunizações, foram colhidos 1 ml de sangue da veia marginal da orelha de cada animal, para serem utilizados como controle. A seguir, os animais receberam a primeira dose (500 µl) de injeções subcutâneas do

4.4. Colheita e armazenamento do sangue

A colheita de sangue semanal foi realizada com agulhas B.D. calibre 21G1 (25 X 8) e seringas esterilizadas de 1 ml marca Plastipak[®] pela veia marginal da orelha de cada animal. Foram colhidos cerca de 1ml de sangue e acondicionados em tubos tipo *Eppendorf* de 2 ml (Figura 4). Os tubos foram armazenados em estufa a 37 °C por 1 h para a retração do coágulo. Esse material foi centrifugado (IEC CENTRA-7R refrigerated centrifuge) a 3000 rpm e o sobrenadante foi aliquotado e armazenado em tubos tipo *Eppendorf* e posteriormente congelados em freezer a -20 °C.



Figura 4. Colheita de sangue da veia marginal do coelho.

4.5. Estudo da resposta imune dos soros colhidos semanalmente

O controle da resposta imune dos soros anti-ciprofloxacina total colhidos semanalmente dos animais imunizados, foram realizados através de ensaios imunoenzimáticos, baseando-se no protocolo adaptado utilizado por Duan e Yuan (2001).

Resumidamente, placas de poliestireno de fundo plano (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ surface) foram sensibilizadas com 50 µl do antígeno cBSA-ciprofloxacina diluídos na proporção de 10 µg/ml em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9, incubadas por 1 h a 37 °C em agitação lenta.

Após a sensibilização e o descarte do líquido excedente as placas foram lavadas uma vez com PBS-T (tampão PBS; 0,05% de Tween 20 pH 7,2). As placas foram bloqueadas 50 µl de tampão de bloqueio BSA 1 % , incubados por 15 minutos a 37 °C. Após este período todo líquido em excesso foi descartado e as placas foram lavadas mais uma vez com PBS-T.

Em seguida, 50 µl dos soros colhidos semanalmente foram diluídos a 1/500 em tampão PBS e adicionados às placas que foram incubadas por 1 h a 37 °C. O excesso do líquido foi descartado e as placas foram lavadas com PBS-T por 3 vezes. As placas foram secas batendo-se em papel absorvente até que o excesso de líquido fosse eliminado. A seguir, 50 µl do conjugado anti-imunoglobulina IgG de coelho (KPL- Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland-USA) marcado com peroxidase diluído na proporção de 1:1000 foram adicionados nas placas e incubadas por 1 h a 37 °C.

Após o término dessa incubação, foram realizadas mais 3 lavagens com PBS-T, a reação foi revelada utilizando como substrato cromogênico a tetrametilbenzina (Sure Blue™ -TMB- microwell peroxidase substrate-KPL), ficando incuba por 30 minutos em local protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 M, procedendo-se a leitura da coloração em leitor de placa de ELISA (Spectra Count™-Packard) a 450 nm. De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio foi que se estabeleceu o melhor dia para o abate dos animais.

4.6. Abate dos animais imunizados

Passados 7 dias da última imunização, os animais foram sacrificados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do CENA/USP. Para minimizar a dor e o desconforto no momento da punção cardíaca, os animais foram sedados com acepromazina (ACEPRAN 0.2% - Univet S.A. Rua Clímaco Barbosa, 700 – São Paulo, SP), sendo administrado 1 mg por kg de peso vivo intramuscular.

A colheita de sangue total foi realizada com agulhas B.D. calibre 19 G1 1/4 (30x10) e seringas esterilizadas de 50 ml marca Plastipak®. O sangue foi colhido calmamente para evitar hemólise e posteriormente armazenado em tubos próprios para centrifuga refrigerada Sorvall (mod. RC2-B). Esses tubos foram armazenados em estufa a 37 °C por 1 h, para a retração do coágulo e posteriormente centrifugado a 3000 rpm. O sobrenadante foi dividido em alíquotas de 1 ml em tubos tipo *Eppendorf* e congelados em freezer a - 20 °C

4.7. Estudo das diluições dos soros

Os soros dos 3 animais foram diluídos nas concentrações de 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 e 1/1000 frente à concentração de 10 µg/ml da ciprofloxacina-cBSA.

4.7.1. Fase sólida

Placas de poliestireno de fundo plano (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ surface) foram sensibilizadas com o antígeno diluído na concentração adequada em

tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,6 pipetando-se 100 µl por poço, sendo incubadas por 2 horas a 37 °C, seguida de incubação por 18 horas a 4° C.

Após a sensibilização e o descarte do líquido excedente, as placas foram bloqueadas com 200 µl por poço com as soluções caseína 2,5 %, incubadas por 2 horas a 37 °C. Após este período, todo líquido em excesso foi descartado e as placas foram então lavadas com PBS-T.

Em seguida, 100 µl dos soros dos 3 coelhos diluídos em tampão PBS caseína 0.5 %, pH 7,2 nas concentrações estabelecidas, foram adicionados às placas incubadas por 1 h a 37 °C.

O excesso do líquido foi descartado e as placas foram lavadas com PBS-T por 3 vezes. As placas foram secas batendo-se em papel absorvente até que o excesso de líquido fosse eliminado. A seguir, 100 µl do conjugado anti-imunoglobulina IgG de coelho (KPL- Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland-USA) marcado com peroxidase foi diluído na proporção de 1:1000 e adicionados nas placas sendo incubadas por 1 h a 37 °C.

Após o término dessa incubação, foram realizadas mais três lavagens com PBS-T, a reação foi revelada utilizando como substrato o TMB, ficando incubada por 30 minutos em local protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 M, procedendo-se à leitura da coloração em leitor de placa de ELISA (Spectra Count™ -Packard) a 450 nm.

4.8. Purificação de soro de coelho anti-ciprofloxacina-cBSA

4.8.1. Separação da gama globulina de coelho anti-ciprofloxacina-cBSA

Em frasco tipo *Erlenmeyer* acondicionado em banho de gelo, foram adicionados 3 ml de soro do coelho 1. Para o processo de *Salting out*, completou-se o volume para 5 ml com solução fisiológica (NaCl 0,15 M). Na sequência, foi adicionada, gota a gota, 5 ml de solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) a 80% de saturação, mantendo essa mistura a 4° C por 24 horas, sob agitação. Após esse processo, o material foi centrifugado (Eppendorf – Centrifuge 5810R) a 10.000 rpm por 10 minutos a 4° C. O sedimento obtido foi ressuspendido delicadamente em cerca de 10 ml de solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 40% e o sobrenadante descartado; esse processo foi realizado por mais 3 vezes, onde na última lavagem o sedimento foi ressuspendido em 1ml de tampão PBS pH 7,2. Posteriormente, esse material foi dialisado em membrana própria para diálise contra tampão PBS por 18 h a 4° C. Nesse processo é importante trocar a solução de PBS por no mínimo 2 vezes, para retirada do excesso de sulfato de amônio presente na amostra. Após o término da diálise, o conteúdo protéico do soro purificado foi determinado pelo método de Lowry (1981).

4.8.1.1. Absorção da IgG de coelho purificada

I) Preparo da coluna

Solução de BSA (10mg/ml) foi dialisada contra tampão carbonato/bicarbonato 0,2M, NaCl 0,5M, pH 8,5 (tampão de ligação) por 18 horas, a 4 °C. Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio foi tratada com ácido clorídrico (HCl) 1 mM em agitação branda por 15 minutos e lavada com HCl 1mM (aproximadamente 2 litros) em funil tipo Buchner para preservar a atividade dos grupos reativos. Após lavagem do gel com tampão de ligação, a solução protéica foi adicionada, e a mistura foi agitada por 18 horas, a 4 °C. Os grupos ativos remanescentes foram bloqueados pela adição de etanolamina 1 M pH 8,0 e agitação branda por 2 horas, à temperatura ambiente. Após, o gel foi lavado 5 vezes com tampão de ligação e com tampão acetato 0,1M, NaCl 0,5M pH 4,0 alternadamente e por último com PBS contendo 0,001% de timerosal (PBS-timerosal). Coluna de vidro de 5 cm de altura e 1,6 cm de diâmetro foi preparada com 10 ml do gel.

II) Cromatografia

A solução de I de IgG de coelho purificada (15mg/ml) foi adicionada à coluna. Após incubação por 18 horas a 4° C, a coluna foi lavada com PBS- timerosal a 1/10.000 e volumes de 2 ml foram colhidos e dosados quanto ao conteúdo protéico (absorbância a 280 nm). O primeiro pico referente à IgG anti-ciprofloxacina livre de anticorpos contra BSA foi dialisado contra PBS, concentrado em sistema de filtração AMICON, e o conteúdo protéico dosado pelo método de Lowry (1981). A

especificidade do anticorpo obtido foi avaliada por ELISA na presença de diferentes antígenos, para conseguirmos avaliar possíveis reações inespecíficas.

4.8.1.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Placas de poliestireno de fundo plano (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ surface) foram sensibilizada com 100 µl de cBSA-ciprofloxacina; BSA 1%; ciprofloxacina e ciprofloxacina na concentração de 5 µg/ml, diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,6. As placas foram incubadas por 2 horas a 37 °C, seguida de incubação por 18 horas a 4° C.

Após a sensibilização e o descarte do líquido excedente, as placas foram bloqueadas com 200 µl por poço com caseína 2,5 % e incubadas por 2 horas a 37 °C. Após este período, todo líquido em excesso foi descartado e os poços foram lavados com PBS-T 3 vezes. Em seguida foram pipetados 100 µl em cada poço das seguintes frações obtidas no processo de purificação: IgG de coelho total, anticorpos anti – ciprofloxacina e anti – BSA e diluímos em PBS caseína 0,5% as frações nas seguintes concentrações: 1/50; 1/100; 1/200; 1/400; 1/800 e 1/1600. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C.

Após o término da incubação, o excesso do líquido foi descartado e os poços foram novamente lavados com PBS-T por mais 3 vezes. As placas foram secas batendo-se em papel absorvente até que o excesso de líquido fosse eliminado. A seguir, foi feita uma nova incubação com conjugado anti-imunoglobulina IgG de coelho marcado com peroxidase, diluído na proporção de 1:1000 por um período de 1 hora a temperatura constante de 37 °C.

Terminado o período de incubação foram realizadas mais 3 lavagens com PBS-T. A reação foi revelada utilizando como substrato TMB por 30 minutos em local protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando uma solução de H_2SO_4 2 M, procedendo-se à leitura da coloração em leitor de placa de ELISA (Spectra CountTM-Packard), a 450 nm.

4.9. Preparo dos conjugados enzimáticos IgG de coelho anti-ciprofloxacina e da ciprofloxacina

Conjugados enzimáticos de IgG de coelho contra a ciprofloxacina e a ciprofloxacina foram preparados para serem utilizados no teste enzimático de competição com a finalidade de detectar a ciprofloxacina em produtos de origem animal.

4.9.1. Conjugado enzimático IgG de coelho anti-ciprofloxacina – peroxidase

A IgG de coelho anti-ciprofloxacina foi conjugada a peroxidase, segundo metodologia descrita por Wilson & Nakane (1978).

Para tanto, 5mg/ml da peroxidase tipo VI (SIGMA CHEMICAL Co, St Louis, MO, USA) foi oxidada com uma solução de metaperiodato de sódio 0,1M (NaIO_4 - SIGMA CHEMICAL Co, St Louis, MO, USA) durante 30 minutos, à temperatura ambiente e imediatamente colocada em diálise contra tampão acetato de sódio 0,001M, pH 4,4 (MERCK, RJ, BR) por 24 horas a 4°C. A seguir, 2ml da IgG de coelho anti-ciprofloxacina (42 mg/ml de proteína) foram diluídos em solução fisiológica. A alcalinização da peroxidase oxidada e do antisoro se deu através da

adição de 50µl de tampão carbonato/ bicarbonato 0,5M, pH 9,5, em cada solução. Procedeu-se a conjugação pela adição lenta da solução do antissoro a peroxidase por 2 horas, à temperatura ambiente sob agitação moderada. Para estabilização do conjugado foi adicionado 130 µl de borohidreto de sódio 0,1M (NaHB_4 - SIGMA CHEMICAL Co, St Louis, MO, USA). Após nova incubação por 2 horas em temperatura ambiente, o conjugado foi dialisado contra PBS 0,01M pH 7,2 a 4°C, por 24 horas, aliquoteado v/v com glicerina bidestilada e conservado a -20°C, até o momento do uso.

4.9.1.1. Avaliação do conjugado enzimático IgG de coelho anti-ciprofloxacina – peroxidase por ELISA

Placas de poliestireno de fundo plano (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ surface) foram sensibilizada com 100 µl de IgG de coelho anti-ciprofloxacina na diluição de 1/50, diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,6. As placas foram incubadas por 2 horas a 37 °C, seguida de incubação por 18 horas a 4° C.

Após a sensibilização e o descarte do líquido excedente, as placas foram bloqueadas com 200 µl por poço com caseína 2,5 % e incubadas por 2 horas a 37 °C. Após este período, todo líquido em excesso foi descartado e os poços foram lavados com PBS-T 3 vezes. Em seguida foram pipetados 100 µl da ciprofloxacina nas seguintes concentrações: 1000 µg/ml; 200 µg/ml; 40 µg/ml; 6 µg/ml; 1,6 µg/ml e 0 µg/ml. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C.

Após o término da incubação, o excesso do líquido foi descartado e os poços foram novamente lavados com PBS-T por mais 3 vezes. As placas foram secas batendo-se em papel absorvente até que o excesso de líquido fosse

eliminado. A seguir, nova incubação com conjugado IgG de coelho anti-ciprofloxacina marcado com peroxidase diluídos nas proporções de 1/100; 1/500 e 1/1000 por um período de 1 hora a temperatura constante de 37 °C.

Terminado o período de incubação foram realizadas mais três lavagens com PBS-T. A reação foi revelada utilizando como substrato cromogênico a tetrametilbenzina por 30 minutos em local protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando uma solução de H₂SO₄ 2 M, procedendo-se à leitura da coloração em leitor de placa de ELISA (Spectra CountTM-Packard), a 450 nm.

4.9.2. Conjugado enzimático IgG de coelho anti-ciprofloxacina - biotina

A conjugação da IgG de coelho anti-ciprofloxacina com a biotina seguiu o protocolo definido por Diamandis e Cristopoulos (1991). Dez microlitros do éster de biotinamidocaproato N-hidroxisuccinamida 0,1 M em dimetilformamida (DMF) foram adicionados a 1 ml da solução de gama globulina (2 mg/ml em tampão PBS, pH 7,2), previamente dialisada contra carbonato de sódio (NaHCO₃) 0,1 M por 24 h, a 4° C. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 4 h, sob leve agitação. Após, nova diálise contra tampão PBS pH 7,2 por 24 horas a 4° C. O material dialisado foi diluído a 1:2 em glicerina bidestilada e mantido a - 20° C protegido da luz.

4.9.2.1. Avaliação do conjugado enzimático IgG de coelho anti-ciprofloxacina – biotina por ELISA

Placas de poliestireno de fundo plano (Nunc-ImmunoTM Plate MaxisorpTM surface) foram sensibilizada com 100 µl de IgG de coelho anti-ciprofloxacina na

concentração de 1/50, diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,6. As placas foram incubadas por 2 horas a 37 °C, seguida de incubação por 18 horas a 4° C.

Após a sensibilização e o descarte do líquido excedente, as placas foram bloqueadas com 200 µl por poço com caseína 2,5 % e incubadas por 2 horas a 37 °C. Após este período, todo líquido em excesso foi descartado e os poços foram lavados com PBS-T 3 vezes. Em seguida foram pipetados 100 µl da ciprofloxacina nas seguintes concentrações: 1000 µg/ml; 100 µg/ml; 10 µg/ml; 1 µg/ml; 0,1 µg/ml e 0 µg/ml. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C.

Após o término da incubação, o excesso do líquido foi descartado e os poços foram novamente lavados com PBS-T por mais 3 vezes. A seguir, foi feita uma nova incubação com conjugado anti-imunoglobulina IgG de coelho marcado com biotina, diluídos nas proporções de 1/50; 1/200 e 1/800 por um período de 1 hora a temperatura constante de 37 °C.

Terminado o período de incubação foram realizadas mais 3 lavagens com PBS-T e adicionamos 100 µl do conjugado estreptavidina-peroxidase na concentração de 1/1000, incubando por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelada utilizando como substrato oTMB por 30 minutos em local protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando uma solução de H₂SO₄ 2 M, procedendo-se à leitura da coloração em leitor de placa de ELISA (Spectra CountTM-Packard), a 450 nm.

4.9.3. Conjugado enzimático ciprofloxacina - peroxidase

A conjugação baseou-se no protocolo descrito por Avrameas et al., (1978). Primeiramente, dissolveu-se 10 mg da peroxidase VI (SIGMA CHEMICAL

Co, St Louis, MO, USA) em 200 µl de glutaraldeído na concentração de 1%, durante 18h em temperatura ambiente. Após término da incubação, essa mistura foi filtrada em coluna (0,6X30 cm) de Sephadex G-25 (SIGMA CHEMICAL Co, St Louis, MO, USA) equilibrada com 0,15M de cloreto de sódio (NaCl). A coluna de vidro foi preparada com pérolas e lã de vidro, que foram gentilmente colocadas no fundo da coluna para evitar o vazamento do gel. Para o preparo do gel, pesou-se 20 g de Sephadex G-25 diluída em 100 ml água MilliQ aquecida com a finalidade de intumescer as partículas. O gel aquilibrado foi adicionado na coluna de vidro preparada anteriormente.

Adicionou-se na coluna a solução da peroxidase conjugada com o glutaraldeído. O volume colhido da fração da peroxidase foi concentrado para 1 ml em sistema de filtração AMICON. Posteriormente foi adicionado 2,5 mg da ciprofloxacina diluída em NaCl 0,15 M juntamente com 200 µl de tampão carbonato/bicarbonato 1 M pH 9,5, incubada por 24 horas a 4° C.

Ao término dessa incubação, foram adicionados 200 µl de lisina 1M pH 7, para bloquear os sítios ativos remanescentes, durante um período de 2 horas. Essa mistura foi então dialisada contra tampão PBS por um período de 24 horas e depois filtrada em membrana de Millipore estéril (0,22 µ) com o auxílio de uma seringa. A ciprofloxacina marcada com a peroxidase dialisada foi aliquoteada em frasco tipo âmbar e posteriormente adicionada glicerina bidestilada v/v.

4.9.3.1. Avaliação das diluições da IgG de coelho anti-ciprofloxacina utilizando a ciprofloxacina conjugada com a peroxidase do kit RIDASCREEN® Enro/Cipro

Primeiramente, para avaliarmos a eficiência da IgG de coelho anti-ciprofloxacina, foi necessário testa-la novamente em diferentes concentrações, utilizando o conjugado enzimático do kit referência, para conseguirmos obter uma maior sensibilidade do teste.

O teste no método competitivo direto, semelhante ao utilizado pelo teste referência *RIDASCREEN® Enro/Cipro da R-Biopharm*. Resumidamente, foram utilizadas placas de poliestireno (Nunc-Immuno™ Plate polisorp™ surface) com 96 poços previamente sensibilizadas com um anticorpo anti - IgG de coelho (CER-Laboratory of Hormonology). Em cada poço, adicionou-se 50 µl da amostra (leite comercial) fortificado artificialmente com a ciprofloxacina nas seguintes concentrações: 1 µg/ml; 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml e 0,001 µg/ml. Em seguida, adicionamos 50 µl da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase padronizada pelo *kit*. Na seqüência, pipetamos 50 µl do anticorpo anti-ciprofloxacina purificado nas concentrações de: 1/10; 1/500 e 1/1000. Paralelamente a esse ensaio, fizemos uma placa com o *kit RIDASCREEN® Enro/Cipro*, para podermos avaliar a eficiência das diluições da IgG de coelho anti-ciprofloxacina . As placas foram incubadas entre 20 - 25 °C por um período de 1 hora.

O excesso do líquido foi descartado e os poços foram então lavados com 250 µl de PBS-T por 3 vezes. A seguir, nova incubação com o TMB produzido pelo fabricante foi realizada por um período de 15 minutos, em local protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando uma solução de H₂SO₄ 2 M, procedendo-se à

leitura da coloração em leitor de placa de ELISA (Spectra Count™ -Packard), a 450 nm.

4.9.3.2. Avaliação da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase juntamente com a IgG de coelho anti-ciprofloxacina

A padronização do ensaio imunoenzimático para detectar resíduos de ciprofloxacina em produtos de origem animal foi baseada no método competitivo direto, semelhante ao utilizado pelo teste referência *RIDASCREEN® Enro/Cipro da R-biopharm*. Resumidamente, foram utilizadas placas de poliestireno (Nunc-Immuno™ Plate polisorp™ surface) previamente sensibilizadas com um anticorpo anti - IgG de coelho (CER-Laboratory of Hormonology). Em cada poço, adicionou-se 50 µl da amostra (leite comercial) fortificado artificialmente com a ciprofloxacina nas seguintes concentrações: 1 µg/ml; 0,5 µg/ml e 0,1 µg/ml. A ciprofloxacina conjugada com a peroxidase preparada no laboratório de Malária do Instituto de Medicina Tropical da USP foi adicionada (50 µl) em seguida nas concentrações de 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800. Na seqüência, pipetamos 50 µl do anticorpo anti-ciprofloxacina purificado na concentração de 1/10. Paralelamente a esse ensaio, outro ensaio foi realizado com o *kit RIDASCREEN® Enro/Cipro*, seguindo o mesmo esquema de ensaio. As placas foram incubadas entre 20 - 25 °C por um período de 1 hora.

O excesso do líquido foi descartado e os poços foram então lavados com 250 µl de PBS-T por 3 vezes. A seguir, nova incubação com o TMB produzido pelo fabricante foi realizada por um período de 15 minutos, em local protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando uma solução de H₂SO₄ 2 M, procedendo-se à

leitura da coloração em leitor de placa de ELISA (Spectra Count™ -Packard), a 450 nm.

4.9.3.3. Padronização do ELISA de competição

A padronização do ELISA de competição para detectar resíduos de ciprofloxacina em produtos de origem animal, foi realizada comparando os imunoreagentes produzidos *in house*, kit RIDASCREEN® Enro/Cipro e a mistura desses imunoreagentes.

Os testes foram realizados seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.9.4.1, utilizando como amostra leite orgânico devidamente certificado da ausência de resíduos antimicrobianos (leite desnatado Sítio Caipirinha, certificado IBD). A concentração da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase preparada *in house* utilizada para esse teste foi de 1/400 e do leite fortificado foi de: 0 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml e 0,1 ug/ml.

Os dados obtidos da padronização desse teste foram posteriormente analisados e correlacionados com o kit referência RIDASCREEN® Enro/Cipro da R-Biopharm.

5. Resultados e discussão

5.1. Preparo do antígeno

O sistema imune é capaz de responder a um determinado antígeno através da atuação e interação entre células apresentadoras de antígenos, linfócitos B e linfócitos T. Quando essas macromoléculas estranhas entram em contato com o sistema imune, estas as reconhecem e reagem contra elas. Nesta situação, o antígeno é denominado imunógeno, havendo a produção de anticorpos pelos linfócitos B, ativação de linfócitos T e geração de células de memória, cuja função será eliminar ou conter a disseminação do antígeno.

Apenas as regiões mais polares e expostas da molécula de antígeno são capazes de estimular a formação de anticorpos pelos linfócitos B. Essas porções mais superficiais são denominadas determinantes antigênicos ou epítomos, e interagem com o sítio de ligação do anticorpo (Nunes, 2005). Essas interações são mantidas por forças fracas, iguais as que mantêm o complexo enzima-substrato, denominadas por forças iônicas, pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals e hidrofóbicas. O fato dessas forças apresentarem baixa energia livre (< 20 Kcal/mol), diferentemente das ligações covalentes (> 40 Kcal/mol), garantem o fenômeno de propriedades importantes das interações antígeno-anticorpo, como o estudo de avides de anticorpos IgG.

A maioria das proteínas e peptídeos de elevado peso molecular são imunógenos naturais, ou seja, são capazes de desencadear uma resposta imunológica sem nenhum tipo de modificação na sua estrutura química.

A produção de anticorpos bem sucedida envolve a preparação adequada do imunógeno. Para isso é necessário que eles apresentem grupos funcionais susceptíveis de serem conjugados a uma proteína carreadora, quando incapazes de gerarem a produção de anticorpos. Segundo Nunes (2005) a geração de anticorpos para moléculas pequenas é extremamente complexa, porque moléculas que possuem baixo peso molecular não são hábeis para produção de anticorpos.

Para Myllyniemi (2004) os métodos imunológicos costumam ser muito utilizados na detecção e identificação de resíduos antimicrobianos, caracterizando os ensaios imunológicos como um método bem conhecido para detectar esses resíduos nos produtos de origem animal. Com esses embasamentos, nosso projeto de pesquisa visou o preparo e o desenvolvimento de reagentes imunoenzimáticos que pudessem ser utilizados na detecção de resíduos de antibióticos em diferentes compostos. Produzimos anticorpos policlonais contra a ciprofloxacina, uma fluoroquinolona de segunda geração, amplamente utilizada na prevenção e tratamento de doenças, tanto em animais de produção, incluindo a piscicultura, como também em humanos.

Esse fármaco apresenta grande atividade antimicrobiana contra a maioria das bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas, além de ter seu espectro de atuação ampliado pela presença de um átomo de flúor no carbono 6 e do anel piperazinila no carbono 7.

Como a ciprofloxacina é uma molécula de baixo peso molecular (331,4 KDa), tivemos que fazer o acoplamento dessa molécula a uma proteína carreadora de alto peso molecular.

Muitas proteínas carreadoras quando conjugadas ao hapteno conferem a este imunogenicidade, e se inoculadas em animais, farão com que estes produzam

anticorpos contra os epítomos dos haptenos e da proteína carreadora. Existem muitas opções de proteínas que podem ser usadas como carreadoras, basicamente elas se diferenciam pela capacidade imunogênica, solubilidade e disponibilidade de grupamentos funcionais que irão se conjugar ao composto escolhido.

O BSA é umas das proteínas carreadoras mais utilizadas na produção de anticorpos, sendo um polipeptídio com 59 resíduos de lisina, dentre os quais 30 a 35 possuem grupamentos aminos susceptíveis de atuarem com os reagentes utilizados nos inúmeros processos de conjugação.

Diante dessas informações, utilizamos o reagente *Imject® Pharmalink™ Immunogem Kit*, desenvolvido pela PIERCE BIOTCHENOLOGY, para conjugarmos covalentemente a ciprofloxacina ao BSA cationizado. Quando se cationiza o BSA, os grupamentos carboxílicos presente são modificados com a finalidade de alterar o pI (ponto isoelétrico) básico para um valor acima de 10, realçando as propriedades imunogênicas do conjugado. Porém, mesmo com essa mudança de pI , as quantidades de lisinas presentes na molécula não são alteradas.

Para Coillie et al. (2004) a grande vantagem no uso de proteínas carreadoras cationizadas é que muitos dos grupamentos aminos dessas proteínas tornam-se disponíveis no processo de conjugação, minimizando com isso o efeito das reações cruzadas inespecíficas, pois antígenos cationizados têm maior afinidade pelas membranas celulares dos anticorpos produzidos, internalizando e processando essa interação com maior eficiência.

Geralmente os processos de conjugações geram resíduos que irão interferir na produção de anticorpos. Muitas vezes esses resíduos são moléculas que não conseguiram se conjugar ou mesmo os próprios reagentes utilizados no processo de conjugação que de alguma forma acabam interferindo na produção de

anticorpos específicos. Para eliminar esses resíduos, purificamos o conjugado em colunas próprias do *kit* comercial. Em seguida verificamos a eficiência dessa conjugação, para sabermos se o processo de conjugação obteve êxito. Essa eficiência foi baseada no volume inicial do conjugado antes de ser purificado (450 µl) pelo volume obtido do *pool* das frações 4 – 6 que conseguimos recuperar após o processo de purificação (1500 µl). Analisando esses dados, concluímos que a eficiência do conjugado foi de aproximadamente 75%, valor esse considerado satisfatório. A grande eficiência obtida se dá principalmente pelo fato que todo o processo químico utilizado durante a conjugação foi mantido em pH ácido, favorecendo um meio estável para esse processo (Muckerheide *et al.*, 1987).

Quando analisamos a estrutura química desses 2 compostos, observamos que a molécula do cBSA apresenta 6 grupamentos aminos preliminares, favorecendo uma ligação covalente junto ao grupamento amino apresentado pela molécula da ciprofloxacina, portanto, para cada molécula do cBSA temos 6 moléculas de ciprofloxacina conjugada (Figura 5).

Coillie et al. (2004) conjugaram moléculas de flumequina ao cBSA para a produção de anticorpos policlonais em frangos com a finalidade de detectar resíduos de flumequina em leite. Esses autores obtiveram uma eficiência de 13,91 mol de flumequina por mol de cBSA, o que também foi considerando satisfatório pelos autores.

Essa etapa foi muito importante, pois através desses cálculos estabelecemos a quantidade ideal do conjugado para imunizar os animais.

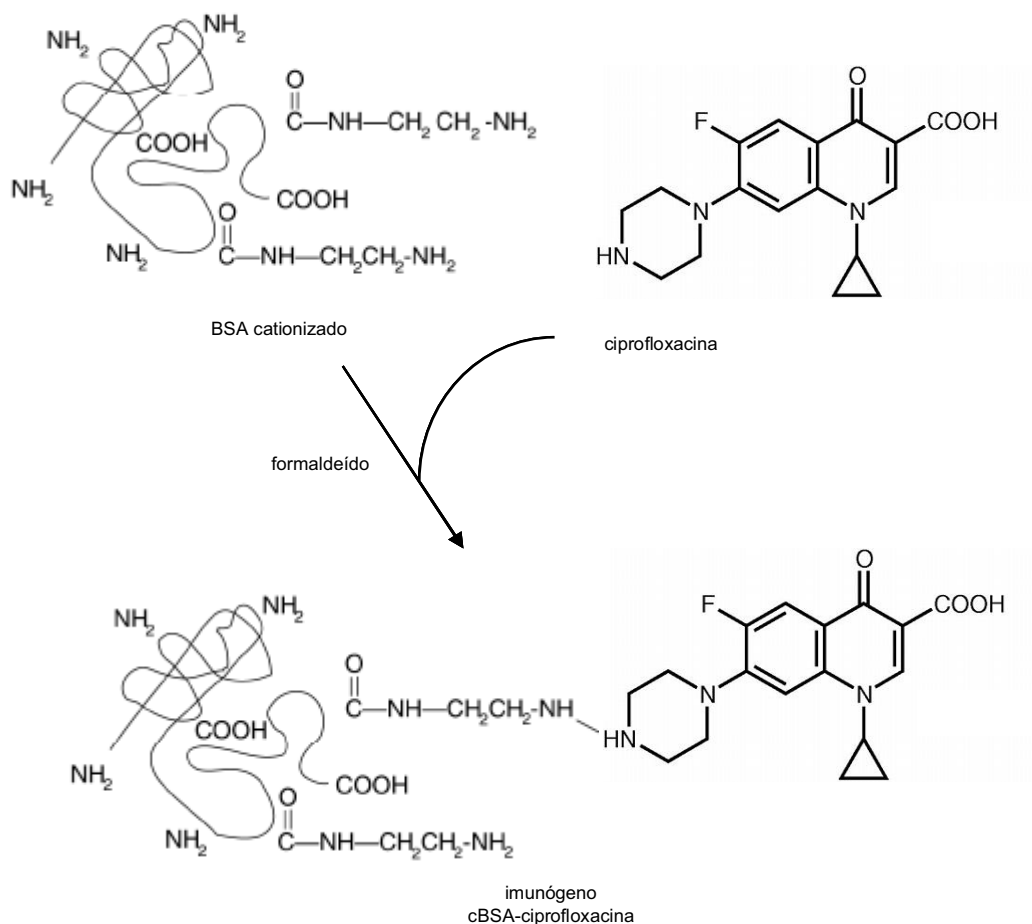


Figura 5. Processo de conjugação das moléculas ciprofloxacina e BSA cationizado utilizando o reagente *Imject® Pharmalink™ Immunogem kit*.

5.2. Estudo da resposta imune dos soros

O objetivo principal do desenvolvimento de um imunoensaio é conseguir o máximo de reconhecimento por parte do anticorpo em relação a um antígeno desejado. Para conseguirmos alcançar esse objetivo, foram realizadas 5 imunizações em cada animal, com colheita semanal de sangue para avaliações parciais, que foram posteriormente titulados em ensaios imunoenzimáticos do tipo PTA-ELISA (“Plate Traped Antigen – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”).

Os títulos obtidos dos soros antes e após o abate dos animais foram analisados no teste ELISA frente ao antígeno ciprofloxacina-cBSA na concentração de 10 µg/ml. Os resultados obtidos no teste ELISA estão apresentados na Tabela 3 e Figura 6.

Tabela 3. Densidades ópticas obtidas no teste ELISA dos soros colhidos semanalmente dos animais imunizados.

	Resultados do ELISA (D.O)								
	Semanas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Coelho 1	0,228	0,260	0,207	-	0,323	1,442	1,504	1,502	1,398
Coelho 2	0,353	0,347	0,497	-	0,393	0,914	1,486	1,404	1,292
Coelho 3	0,244	0,370	0,292	-	1,218	1,508	1,514	1,514	1,481

Analisando os resultados apresentados na Tabela 3 e Figura 6, podemos observar que:

I) A reatividade dos soros pré-imune (semana 1) dos 3 coelhos apresentaram baixa reatividade frente ao antígeno e aumentaram com as imunizações durante as semanas, demonstrando um bom estímulo do sistema imunológico desses animais contra o imunógeno.

II) Podemos notar que os títulos de anticorpos variaram de acordo com o animal imunizado, sendo que as reatividades foram maiores nos animais 1 e 3, mesmo assim só alcançaram valores constantes de D.O. a partir da 6ª semana.

III) Não apresentamos resultados dos soros na semana 4 devido ao fato dos animais apresentarem ferimentos nas orelhas o que poderia comprometer as colheitas subseqüentes.

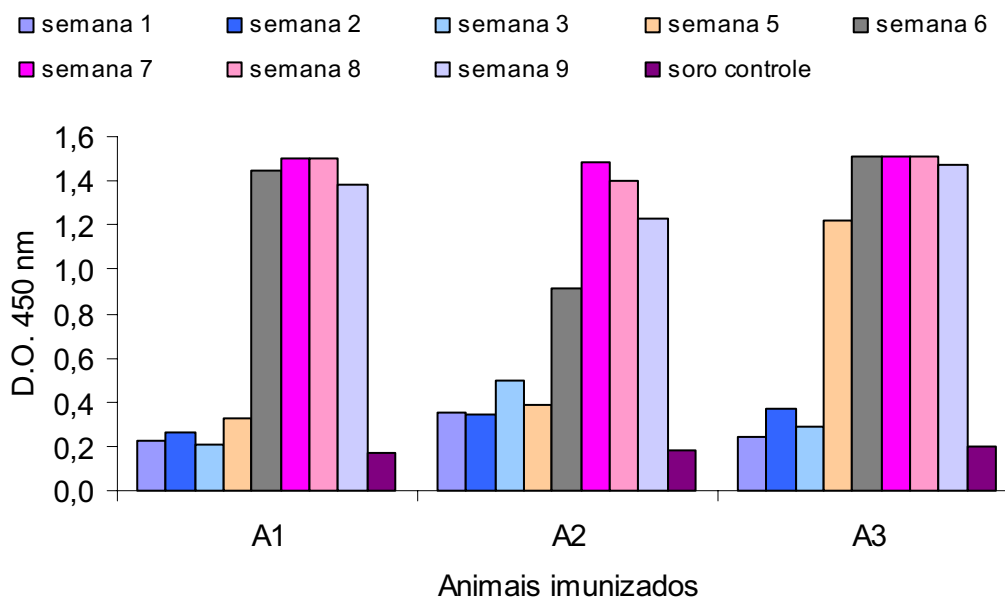


Figura 6. Resultados da titulação no teste ELISA dos soros colhidos semanalmente dos animais imunizados.

A decisão sobre qual soro usar durante o processo de padronização dos imunoreagentes, só foi possível quando analisamos a melhor resposta antígeno-anticorpo estabelecida a seguir.

5.2.1. Estudo das diluições dos soros

As determinações dos melhores títulos de anticorpos dos 3 animais foram avaliadas por ELISA através de diluições seriadas, que variaram de 1/10 a 1/1000

dos soros dos 3 animais colhidos na semana 9 (sangria total) frente ao antígeno ciprofloxacina - cBSA na concentração de 10 µg/ml.

Essa parte de caracterização de anticorpos é necessária porque à medida que maiores concentrações de anticorpos são adicionadas a uma quantidade constante de antígenos nas placas testadas, poderá ocorrer um excesso de anticorpos que irá atrapalhar a reação, resultando em um efeito denominado pró-zona, ou seja, diminuição do sinal da reação por excessos de anticorpos. Os resultados dessa avaliação estão apresentados na Figura 7.

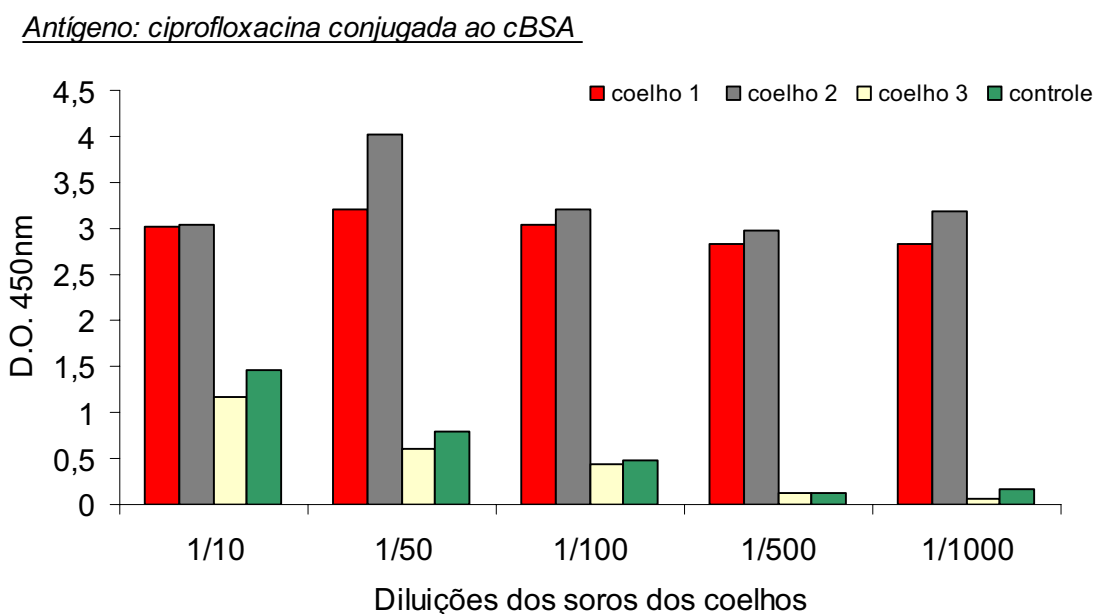


Figura 7. Resultados das D.Os para avaliação da produção de anticorpos nos coelhos imunizados frente ao conjugado ciprofloxacina - cBSA na concentração de 10 µg/ml.

Observações importantes podem ser tiradas da análise da Figura 7:

I) Quando as diluições dos soros foram baixas (1/10 e 1/50), verificamos reatividade inespecífica do soro do coelho não imunizado (controle).

II) Em diluições maiores que 1/50 dos soros, a reação inespecífica do soro controle foi desprezível, o que garante boa especificidade no teste final utilizando diluições acima de 1/50.

III) O soro do animal 3 apresentou comportamento semelhante ao soro do animal controle, o que indica que esse soro apresenta reatividade inespecífica, não apresentando características ideais, para ser utilizada na detecção de ciprofloxacina.

IV) O soro do animal 1 foi o que aparentemente apresentou melhor reatividade, porém por não sabermos a importância de possíveis reações inespecíficas desse soro com o BSA, fizemos a purificação desse soro por cromatografia de afinidade.

5.3. Purificação da IgG de coelho

A purificação do soro do coelho 1 em colunas por afinidade foi realizada com o intuito de separar a IgG de coelho anti - ciprofloxacina das possíveis IgG de coelho anti - BSA produzidas durante a imunização. Avaliamos a reatividade imunológica por ELISA das IgG de coelho anti - ciprofloxacina, do anticorpo anti - BSA extraído da coluna de afinidade e a IgG de coelho total resultante da precipitação do soro antes de ser purificado. A especificidade foi avaliada através de testes de reação cruzadas contra diferentes antígenos (BSA, ciprofloxacina – cBSA e ciprofloxacina) na concentração de 5 µg/ml, obtidos em experimentos anteriores. Esses testes foram considerados o principal parâmetro na escolha do melhor antisoro. Os resultados desses testes estão demonstrados na Figura 8.

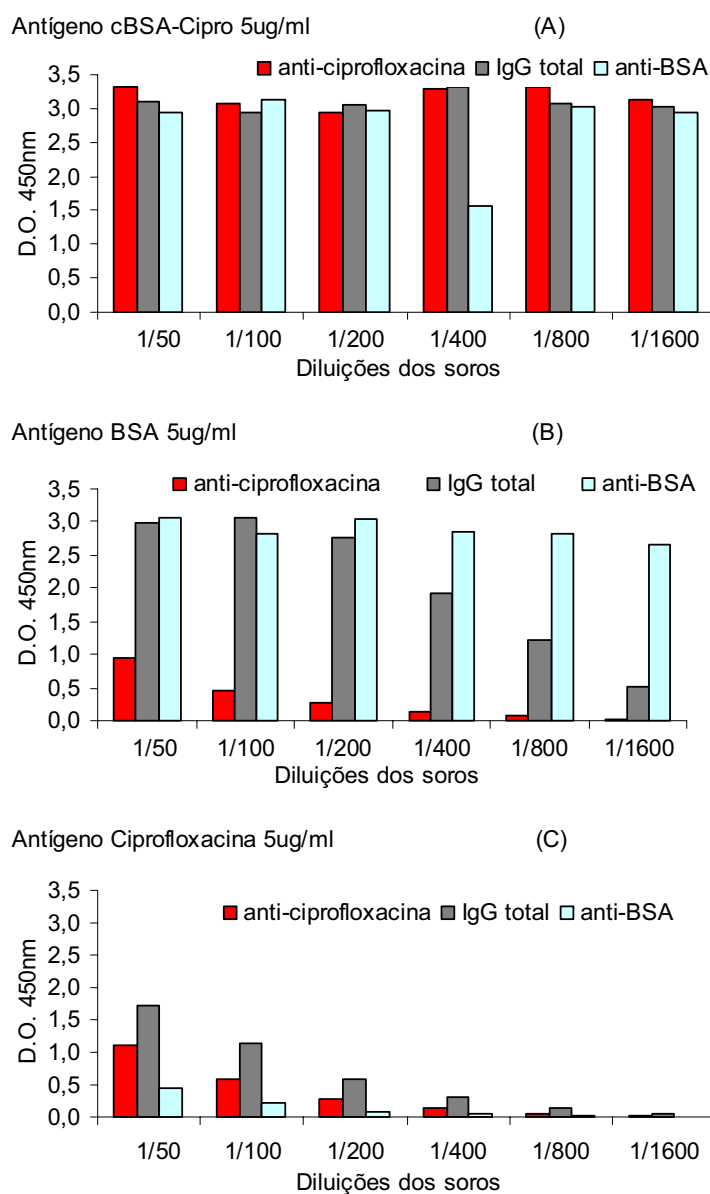


Figura 8. Resultados da purificação da IgG de coelho, avaliando a eficiência da IgG total, anti-ciprofloxacina e anti-BSA, frente a diferentes antígenos utilizando a mesma concentração.

Observações importantes podem ser tiradas da análise dessas figuras:

I) Quando utilizamos o antígeno cBSA conjugado com a ciprofloxacina (Gráfico A), observamos o mesmo comportamento das 3 frações de soros avaliadas,

evidenciando que esse antígeno pode causar reações inespecíficas e resultados duvidosos.

II) Analisando o gráfico B, notamos uma diferença significativa entre os soros testados frente ao antígeno BSA. O soro anti-BSA apresentou alta reatividade com o antígeno, o mesmo ocorreu com a IgG de coelho, porém o soro anti-ciprofloxacina não apresentou boa reatividade com esse antígeno.

III) Quando utilizamos o antígeno ciprofloxacina (Gráfico C), notamos que o soro anti-ciprofloxacina apresentou reatividade com o antígeno, o que não ocorreu com o soro anti-BSA. A IgG de coelho apresentou alta reatividade com o antígeno, resultado semelhante quando comparamos esse antisoro frente ao antígeno BSA 1%, o que indica que esse soro apresenta reações cruzadas frente aos antígenos testados.

Por essas análises, concluímos que o processo de purificação foi essencial na avaliação dos soros e que a análise de reações cruzadas utilizando diferentes antígenos foi fundamental para caracterizarmos a eficiência dos diferentes soros testados. A partir disso estabelecemos que a IgG de coelho anti-ciprofloxacina purificada e produzida *in house* é um bom anticorpo na pesquisa de ciprofloxacina quando utilizada em diluições de 1/50 na presença do antígeno ciprofloxacina 5 µg/ml.

Resultado semelhante a esse foi obtido por Perin et al., (2005) quando produziram soro policlonal estirpe específico de bactérias diazotróficas. Esses autores avaliaram o título dos soros obtidos após o processo de purificação, e consideraram satisfatórios os resultados obtidos até as diluições de 1/100, porém eles levaram em consideração os possíveis efeitos pró-zona, e estabeleceram uma diluição de 1/20 nos ensaios subseqüentes.

5.4. Conjugados enzimáticos

Para avaliarmos a eficiência dos anticorpos conjugados a peroxidase e a biotina, utilizamos o ELISA duplo anticorpo. Esse ensaio consistiu na fixação de um anticorpo da IgG anti-ciprofloxacina purificado na placa e da IgG anti-ciprofloxacina conjugado com as enzimas (biotina e peroxidase) frente a diferentes concentrações de ciprofloxacina. A quantidade do substrato que foi modificada pela ação da enzima foi proporcional à quantidade de antígeno presente. Analisando a eficiência do teste (dados não demonstrados), foi possível observar que os conjugados não apresentaram diferença significativa na capacidade de detectar diferentes concentrações de ciprofloxacina utilizada em ambos os testes. A justificativa para esse resultado é que não utilizamos um anticorpo monoclonal contra a ciprofloxacina para sensibilizar a placa, então provavelmente os anticorpos presentes na placa competiram por diferentes sítios de ligação, pois a IgG de coelho anti - ciprofloxacina purificada marcada com os conjugados não conseguiram discriminar as IgG endógenas presentes no primeiro anticorpo utilizado para sensibilizar a placa.

Baseando-se nos dados encontrados na literatura, em que as maiorias dos autores padronizaram testes imunoenzimáticos de competição para a detecção de antibióticos em matrizes biológicas, resolvemos conjugar a ciprofloxacina a peroxidase.

Ko et al. (2000) padronizaram um ELISA de competição para detectar resíduos de sulfametazina em tecidos de suínos, obtendo dados satisfatórios com esse método. O mesmo ocorreu com Loomans et al. (2003) na detecção de aminoglicosídeos e para Huet et al. (2006) na detecção multiresidual de fluoroquinolonas em músculo de frango, fígado de suínos, camarão, peixe e ovos.

Watanabe et al. (2001) padronizaram um ELISA de competição para detectar resíduos de enrofloxacin em fígado e músculo de frangos e leite de vaca, tornado seu teste referência na Europa para detecção desse resíduo.

O sucesso dessa conjugação foi avaliado juntamente com amostras de leite descrito no próximo item.

5.5. Avaliação das diluições da IgG de coelho anti-ciprofloxacina utilizando a ciprofloxacina conjugada com a peroxidase do kit RIDASCREEN® Enro/Cipro

Primeiramente, para avaliarmos a eficiência da IgG de coelho anti-ciprofloxacina pelo ELISA de competição, foi necessário testar novamente esse soro em diferentes concentrações, utilizando nesse teste somente os reagentes do *kit RIDASCREEN® Enro/Cipro*, para sabermos qual diluição do anticorpo produzido *in house* apresenta a mesma eficiência do anticorpo presente no *kit*. Os resultados desse teste estão descritos na Figura 9.

Para entendermos como foi avaliada a eficiência do anticorpo produzido *in house* é necessário sabermos que os ensaios de competição implicam na competição do antígeno, no caso, a ciprofloxacina presente no leite em concentrações conhecidas, pelo antígeno marcado (ciprofloxacina marcada com a peroxidase), por um número limitado de sítios do anticorpo. Portanto os resultados obtidos foram inversamente proporcionais entre a concentração de antígeno presente nas amostras e as densidades ópticas (D.Os.) obtidas.

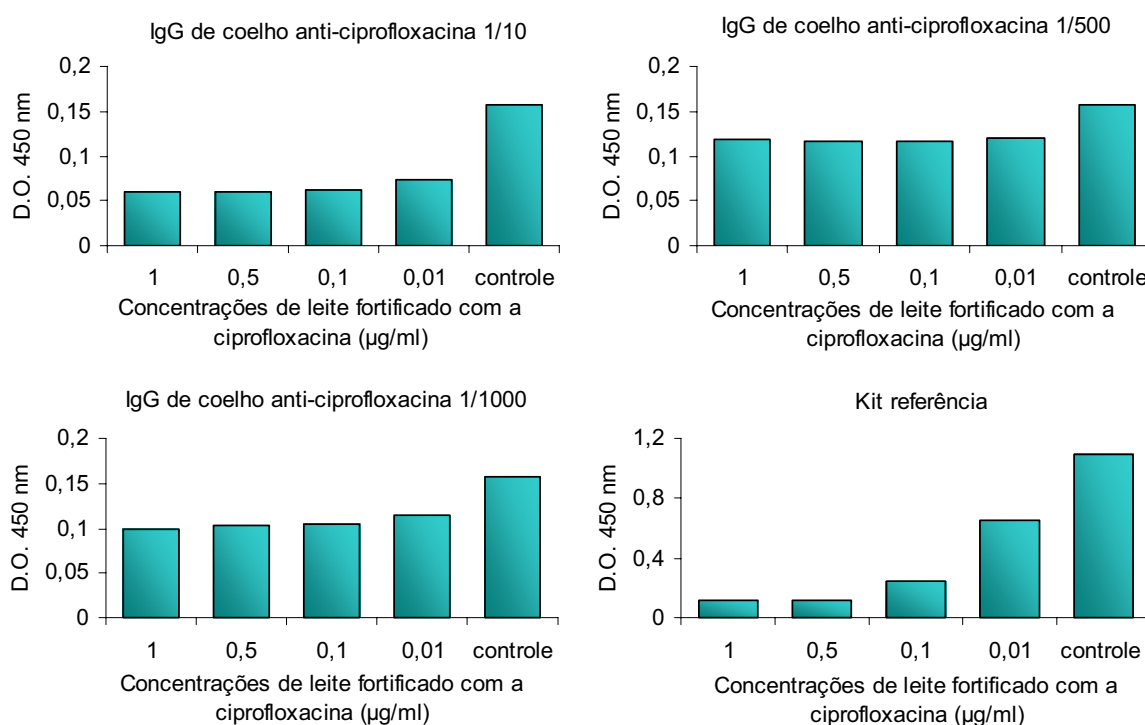


Figura 9. Avaliação das diluições da IgG de coelho anti-ciprofloxacina, utilizando os reagentes do *kit*.

Dessa forma, analisando os dados apresentados na Figura 9, observamos a eficiência do anticorpo produzido *in house* em diferentes diluições. A diluição do soro na proporção de 1/10 foi a que apresentou características semelhantes quando comparadas aos resultados do *kit* referência, demonstrando a grande eficiência do soro produzido *in house* em detectar resíduos de ciprofloxacina em amostras de leite. As outras duas diluições testadas (1/500 e 1/1000) apresentaram dados não significativos quando comparado aos do *kit*, provavelmente as diluições utilizadas fizeram com que a especificidade dos soros diminuíssem.

A partir desses resultados, estabelecemos que em ensaios imunoenzimáticos de competição a diluição da IgG de coelho anti-ciprofloxacina deve ser de 1/10 quando utilizadas para a pesquisa de ciprofloxacina em amostras de leite.

5.5.1. ELISA: ciprofloxacina – peroxidase e IgG de coelho anti - ciprofloxacina purificada

A eficiência da conjugação da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase foi avaliada pelo ELISA de competição, utilizando a IgG anti-ciprofloxacina purificada na concentração de 1/10, comparando os resultados obtidos com o kit referência *RIDASCREEN® Enro/Cipro*.

Foram avaliadas diferentes concentrações da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase (1/100; 1/200; 1/400; 1/800). O leite utilizado foi adquirido diretamente de um supermercado e fortificado com a ciprofloxacina nas seguintes concentrações: 0,5 µg/ml; 0,1 µg/ml e 0,01 µg/ml. Os ensaios de competição seguiram o protocolo descrito pelo fabricante do *kit* referência. As correlações obtidas desses testes estão demonstradas na Tabela 4

Tabela 4 Correlações entre as diferentes diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800) da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase, utilizando o soro IgG de coelho anti - ciprofloxacina a 1/10, frente aos resultados obtidos do kit referência *RIDASCREEN® Enro/Cipro*.

Ciprofloxacina conjugada com a peroxidase	Equação da reta	r^2
Diluição 1/100	$y = 0,0323x + 0,1925$	0,7216
Diluição 1/200	$y = 0,0287x + 0,11$	0,6631
Diluição 1/400	$y = -0,0473x + 0,2905$	<u>0,9588</u>
Diluição 1/800	$y = -0,0397x + 0,2405$	0,4979

Analisando essas correlações, verificamos que a diluição 1/400 da ciprofloxacina conjugada com a peroxidase foi a que apresentou melhor resultado ($r^2 = 0,9588$) quando correlacionado com os resultados obtidos do *kit* referência. Com esse resultado positivo, fica evidente que conseguimos produzir *in house* um imunoreagente semelhante ao utilizado pelo teste referência.

Ko *et al* (2000) desenvolveram um ELISA competitivo para detecção de sulfametazina em tecidos de suínos e conjugaram a sulfametazina a peroxidase utilizando o método do glutaraldeído e conseguiram obter uma eficiência de 10 ng de sulfametazina por kg de tecido de suínos, demonstrando que o teste pode ser utilizado como *screening* na detecção desse resíduo.

5.5.2. Padronização do ELISA de competição

Para Samsonova *et al.* (2005), quando se visa à pesquisa de antibióticos em matrizes biológicas, é necessário avaliarmos a influência dos imunoreagentes obtidos na performance do imunoensaio.

Diante desses fatos, para avaliarmos a eficiência dos imunoreagentes produzidos, foram realizados novos testes substituindo os imunoreagentes do *kit* referência (anticorpo e ciprofloxacina conjugada com a peroxidase) pelos mesmos reagentes produzidos *in house*. Paralelamente, foram feitos testes contendo apenas imunoreagentes *in house* e outro apenas do *kit*, utilizando como amostra leite orgânico devidamente certificado da ausência de resíduos antimicrobianos, para termos maior confiabilidade da eficiência dos parâmetros avaliados. Os resultados desses testes foram avaliados na Figura 10.

Os resultados demonstram que a eficiência dos imunoreagentes produzidos *in house* foram semelhantes aos utilizados no kit referência e a eficiência quando analisada em diferentes situações (substituição de reagentes) demonstraram resultados reprodutivos. Esses resultados indicam boa performance dos imunoreagentes produzidos *in house* quando comparados com os resultados dos imunoreagentes do *kit* referência, demonstrando que o objetivo em detectar resíduos de ciprofloxacina em matrizes biológicas foi alcançado.

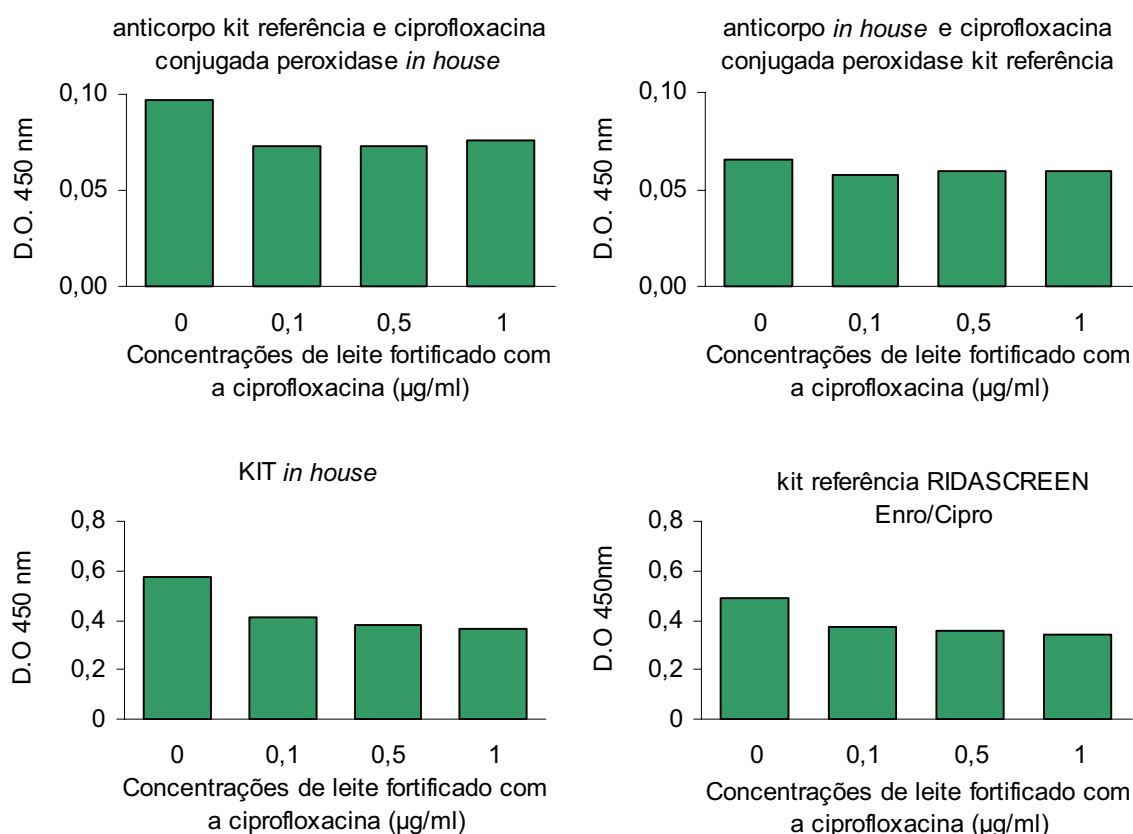


Figura 10. Avaliação da eficiência dos imunoreagentes produzidos *in house*, em diferentes situações.

Um ensaio imunoenzimático quando bem desenvolvido consegue detectar valores residuais em nanogramas, tornando o teste, muitas vezes, tão eficiente quanto sistemas modernos (HPLC, CG-MS, entre outros), como fez Watanabe et al. (2001) que produziram anticorpos monoclonais para detecção de enrofloxacin em matrizes biológicas. Esses autores correlacionaram os resultados obtidos do ELISA com os resultados obtidos do teste confirmatório (HPLC) e conseguiram um coeficiente de correlação de 0,99 para amostras de fígado de frangos e leite de cabra e 0,98 para músculo de frangos. Huet et al (2006) desenvolveram um ELISA multiparamétrico para pesquisa de fluoroquinolonas, e obtiveram resultados satisfatórios para a pesquisa desses fármacos em matrizes biológicas, relatando que métodos imunoenzimáticos são uma ótima ferramenta para a pesquisa de fármacos nessas matrizes.

Testando a especificidade e a exatidão do método competitivo indireto do ELISA contra a ciprofloxacina em alimentos de origem animal, Jiu-hua-Duan e Zonghui-Yuan (2001) chegaram à conclusão de que esse método foi sensível para detectar esse antibiótico em suínos (75,58 %), aves (81,29 %) e leite (84,30%).

Bucknall et al. (2003) avaliaram dois imunoensaio, um específico e outro genérico, com a finalidade de detectar resíduos de diferentes quinolonas e fluoroquinolonas em produtos de origem animal. A conclusão que esses autores chegaram para o ensaio imunoenzimático genérico foi a capacidade de detectar vários tipos de quinolonas e fluoroquinolonas, onde sua utilização é considerada viável quando se analisa um grande número de amostras, porém ele não é capaz de distinguir quais são os tipos detectados. Isso já não ocorreu com o imunoensaio específico, pois o seu teste foi capaz de distinguir qual o tipo de resíduo detectado,

confirmando assim a necessidade se estabelecer metodologias específicas para detecção desses resíduos em produtos de origem animal.

A aceitação e implantação de metodologias baseadas em imunoenaios dependem da clara demonstração de sua qualidade bem como sua validação, quando estabelecemos comparações entre os resultados obtidos com estas técnicas das provenientes dos métodos tradicionais.

Nosso estudo permite concluir que os testes imunoenzimáticos têm se tornado cada vez mais refinados e de execução simples, porém, para se garantir a qualidade dos resultados, é necessário um rígido controle. Segundo Ferreira e Ávila (2001), as técnicas devem ser cuidadosamente padronizadas quanto às concentrações do antígeno, especificidade dos anticorpos, títulos dos conjugados, tempo, temperatura, etc. Estudos sobre resíduos de antibióticos no leite têm sido realizados por vários autores, no Brasil. Contudo, foi observado que os métodos de detecção de resíduos utilizados por grande parte do setor de laticínios são precários e imprecisos. Esse fato traz grande risco à saúde pública, pois muitas vezes podem trazer resultados não condizentes com a realidade (Vieira e Almeida, 2004).

Diante disso, a necessidade de desenvolver métodos analíticos rápidos e eficientes, que tenham a capacidade de detectar resíduos de antibióticos em produtos de origem animal será um grande avanço para o agronegócio e para a pesquisa brasileira. Dessa foram desenvolvendo-se trabalhos de pesquisas intensos e sérios poderemos trazer às cadeias produtivas nacionais de produtos de origem animal métodos tão seguros quanto os tradicionais, de fácil utilização e à custos bem mais atrativos. E como já citado no início dessa discussão, aumentar nossa competitividade e garantia de qualidade de nossos produtos frente aos mais exigentes mercados importadores de produtos brasileiros. Viabilizadas e

implantadas estas novas tecnologias, toda a cadeia produtiva de produtos de origem animal poderá ter garantia de qualidade de seus produtos, tornando-os mais competitivos e atrativos frente a um mercado consumidor extremamente exigente.

6. Conclusões

1. Foram produzidos e padronizados reagentes para a detecção de resíduos de ciprofloxacina em diferentes matrizes biológicas.
2. Os reagentes produzidos *in house* apresentam desempenho semelhante ao reagente comercial, importado da Alemanha.
3. Com os reagentes produzidos *in house* podemos compor um *kit*, a custos reduzidos para ser utilizados pela Vigilância Sanitária e Órgãos de Fiscalização do Governo, com o intuito de assegurar a qualidade dos alimentos destinados a população preservando a saúde humana.

REFERÊNCIAS

- AERTS, M. M. L.; HOGENBOOM, A. C.; BRINKMAN, U. A. Analytical strategies for the creening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 667, n. 1, p. 1-40, 1995.
- AGENCE FRAÇAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS - AFSSA. **High performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the quantification of quinolones in muscle**. Paris, 2000. 26 p.
- ANADÓN, A.; LARRAÑAGA, M. R. M. Eficacia y seguridad de los antimicrobianos utilizados en alimentacion animal – perspectiva europeia. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, 1999, Piracicaba. **Anais...** Campinas: CBNS, 1999a. p. 105-128.
- ANADÓN, A.; LARRAÑAGA, M. R. M. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products. *Livestock Production Science*, **Amsterdam**, v. 59, p. 183-198, 1999b.
- APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 16, p. 5–15, 2000.
- AVISITE. **Produção da carne de frango em fevereiro**. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/economia/prodfran.asp>. Acesso em: 05 abr. 2006.
- AVRAMEAS, S.; TERNYNCK, T.; GUESDON, J. L: Coupling of enzymes to antibodies and antigens. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 8, n. 7, 1978.
- BAYER. EUROPEAN POULTRY SYMPOSIUM, 1., 1995, Leverkusen, Germany, 1995.
- BEIER, R. C.; STANKER, L. H. **Immunoassays for residue analysis: food safety**. Washington: American Chemistry Society, 1996. 621 p. (Symposium Series).
- BENET, L. Z.; KROETZ, D. L.; SHEINER, L. B. A dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos. In: GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 1999. p. 3-20.
- BLONDEAU, J. M. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 21, n. 1, p. 3-40, 1999.
- BOTTEZINI, I. M. P.; CORSO, M. P.; VEIT, V. M. O uso de antibióticos na produção de frangos. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 309, 2002. Disponível em: http://www.dipemar.com.br/carne/309/materia_arttec_carne.htm. Acesso em: 25 jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 193, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para o licenciamento e a renovação de licença de antimicrobianos de uso veterinário, anexo, elaborado pela Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 maio 1998a. Seção 1, p. 114.

BRASIL. Ministério da Saúde, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 448, de 10 de setembro de 1998. Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 set. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Consulta Pública nº 43, 2 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 jun. 2005.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 10, de 27 de abril de 2001 - Dispõe sobre a proibição de importação, produção, comercialização e uso de substâncias naturais ou artificiais, com atividade anabolizante, ou mesmo outras dotadas dessa atividade, mas desprovidas de caráter hormonal, para fins de crescimento e ganho de peso em bovino de abate e revoga a Portaria nº. 51, de 24 de maio de 1991.. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 abr. 2001.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999. **Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP**. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999. Seção 1, p. 213.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agronegócio brasileiro: Uma oportunidade de investimentos**. Brasília, 2006. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 20 abr. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa de análise de resíduos de drogas veterinárias em alimentos**. Brasília: ANVISA, 2001.

BRITO, M. A. V. P. Normas internacionais e exigências do Codex alimentarius e comparação entre blocos comerciais sobre a adoção de testes para detecção de resíduos de antibióticos no leite. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Diagnóstico da qualidade do leite: impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; EPAMIG/CT/ILCT. 2003. 168p.

BROWN, S. A. Fluoroquinolones in animal health. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.19, p.1-14, 1996.

BRUMFITT, W.; FRANKLIN, I.; GRADY, D.; HAMILTON-MILLER, J. M. T.; ILIFFE, A. Changes in the Pharmacokinetics of Ciprofloxacin and Fecal Flora During Administration of a

7-Day Course to Human Volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 26, n. 5, p. 757-761, 1984.

BUCKNALL, S.; SILVERLIGHT, N.; COLDHAM, L. T.; JACKMAN, R. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 3, p. 221-228, 2003.

CODEX MAXIMUM RESIDUES LIMITS FOR VETERINARY DRUGS IN FOODS. Adoptes by the Codex Alimentarius Commission up to and including its twenty second session. Rome: FAO/WHO Food Standards Program, 1997.

COILLIE, E. V.; BLOCK, J. D.; REYBROECK, W. Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 4975-4978, 2004.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. Agropecuária brasileira: Balanço 2005 e perspectivas 2006. Alimento Seguro, dez. 2005. Disponível em: <http://www.alimentoseguro.com.br/noticias2275.asp>. Acesso em: 08 maio 2006.

COUTURIER, M.; BAHASSI, E. M.; VAN MELDEREN, L. Bacterial death by DNA-gyrase poisoning. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 6, n. 7, p. 269-275, 1998.

CROWTHER, J. R. **ELISA: theory and practice**. Vienna: Humana Press, 1995. 223 p. (Methods in Molecular Biology, 42).

DA SILVA, R. G. **Farmacocinética e determinação de resíduos de enrofloxacin e seu metabólito em tecidos de frangos**. 2004. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

DAYAN, A. D. Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 35, p. 213-226, 1993.

DIAMANDIS, E.P.; CRISTOPOULOS, T.K. The biotin-(strep) avidin system: Principles and applications in biotechnology. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 37, p. 625-636, 1991.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotics use in poultry: probiotics. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 75-97, 2003.

ENGLERT, S.I. **Avicultura: tudo sobre raças, manejo, alimentação e sanidade**. 4. ed. Porto Alegre: Agropecuária, 1982. 268 p.

EUROPEAN COMMISSION REGULATION - ECR.. Council Regulation 23/7790/ECC update 2005.

EUROPEAN COMMUNITY - EC.. **Notice to applicants and note for guidance.** Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Paris: Enterprise and Industry Directorate General - Consumer goods – Pharmaceuticals, 2001. v 8.

EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY - EEC. Council Regulation 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of European Communities**, Aberdeen, L 224, p. 1-8, 1990.

EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY - EEC.. Council Regulation No 2377/90 of 26 June 1990. Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits for veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. UNOFFICIAL Consolidated version of the Annexes I to IV of Council Regulation n°2377/90 Updated up to 12 Oct. 2005.

FAGUNDES, C.M. **Persistência de antibióticos no leite bovino em condições experimentais e prevalência nos leites tipo "B" e "C" consumidos em Belo Horizonte.** 1980. 48 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1980.

FAGUNDES, H. **Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subseqüentes em animais com período seco recomendado.** 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

FARIAS, W.V.L.; SADER, H.S.; LEME, I.L.; PIGNATARI, A.C. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 199-204, 1997.

FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. **Diagnostico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes.** 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001. 443 p.

FLEMMING, J. S. **Utilização de leveduras, Probióticos e Mananoligossacarídeos (MOS) na alimentação de frangos de corte.** 2005. 92 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FOOD BORNE antibiotic resistant Campylobacter infections. **Nutrition Reviews**, New York, v. 57, n. 7, p. 224-227, 1999.

GARAU, J.; XERCAVINS, M.; RODRIGUEZ, C.M.; GOMEZ, V.J.R.; COLL, I.; VIDAL, D.; LOVET, T.; RUBIZ, B.A. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia*

coli in the community. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 11, p. 2736-2741, 1999.

GIGOSOS, P.G.; REVESADO, P.R.; CADAHIA, O.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 871, n. 1-2, p. 31-36, 2000.

GRANJA, R. Drogas veterinárias e antibióticos. Um panorama geral em carnes. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004, Balneário Camboriú. 5 p. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_p629m6t.pdf. Acesso em: 02 maio 2006.

HEITZMAN, R. J. Coordination of information on residues of veterinary drugs in the European Community. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 275, p. 17-22, 1993.

HEURTIN, L. C. C.; DONNIO, P. Y.; PERRIN, M.; TRAVERT, M. F.; AVRIL, J. L. Increasing incidence and comparison of nalidixic acid resistant *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype typhimurium isolate from humans and animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 266-269, 1999.

HOLTZAPPLE, C. K.; BUCKLEY, S. A.; STANKER, L. H. Production and characterization of monoclonal antibodies against sarafloxacin and cross-reactivity studies of related fluoroquinolones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 5, p. 1984-1990; 1997.

HUET, A. C.; CHARLIER, C.; TITTELMIER, S. A.; SINGH, G.; BENREJEB, S.; DELAHAUT, P. Simultaneous determination of (fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 8, p. 2822-2827, 2006.

JIN, Y.; JANGA, J-WOOK; LEE, M. H.; HANB, C. H. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 364, p. 260-266, 2006.

JIUHUA, D.; ZONGHUI, Y. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, n. 3, p. 1087-1089, 2001.

JOHNSTON, L.; MACKEY, L.; CROFT, M. Determination of quinolone and fluoroquinolone in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray

ionization tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 982, p. 97-109, 2002.

KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C.; BARNHART, H. M. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poultry Science**, Ithaca, v. 77, p. 243-247, 1998.

KISER, J.S. Subtherapeutic uses of antibiotics and sulfonamides in animal agriculture. In: STTLE, J. H.; JUKAS, T. H.; DUPONT, H. L.; CROWFORD, L. M. **Antibiotics, sulfonamides and public health**. Boca Raton: CRC Press, 1984. v. 1, p. 81-107.

KO, E; SONG, H.; PARK, J. H. Direct enzyme-linked immunosorbent assay for sulfamethazine. **The Journal of Veterinary Medical SciencePublic Healt**, Japan, v. 62, n. 10, p. 1121-1123, 2000.

KOLAR, M.; PANTUELKE, R.; BARDOO, J.; VAGNEROVA, I.; TYPOVSKA, H.; DOSKAR, I.; VALKA, I. Occurrence of antibiotic resistant bacterial strains isolated in poultry feeds. **Veterinary Medicine**, Czech, n. 47, p. 52-59, 2002.

KOLLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, London, v. 256, p. 495-497, 1975.

LAMBIE, N.; NGELEKA, M.; BROWN, G.; RYA, J. Retrospective study on Escherichia coli infection in broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 44, n. 1, p. 155-60, 2000.

LEONARDO, A. L.; CASTRO-PRADO, M. A. A. Avaliação do potencial recombinogênico do antibiótico danofloxacin em células diplóides de *Apergillus nidulans*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, p. 130-135, 2001.

LESHER, G. Y.; FOELICH, E. J.; GRUETT, M. D.; BAILY, J. H.; BRUNDAGE, P. R. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medicinal Pharmaceutical and Chemistry**, Easton, v. 91, p. 1063-1065, 1962.

LOOMANS, E. M. G.; WILTENBURG, J. V.; KOETS, M.; AMERONGEN, A. V. Neamim as an imunogen for development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin and neomycin in milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 587-593, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, D.; FARR, C.; RANDA, R. J. Protein measure with the phenol reagent. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 193, p. 265-275, 1981.

MALORNY, B.; SCHOETER, A.; HELMUT, R. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary Salmonella isolates from Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 9, p. 2278-2282, 1999.

MANDELL, G. L.; PETRI JUNIOR, W. A. Sulfonamidas, trimetoprina-sulfametaxazol, quinolonas e agentes para infecção das vias urinárias. In: GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 1999. p. 777-789.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 172, p. 10-28, 2006.

MIELE, M.; GYROTTO, A. F. Estudos da EMBRAPA - Situação atual e tendência para a avicultura de corte nos próximos anos. **Avicultura Industrial**, São Paulo. Disponível em: http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12024&tipo_tabela=produtos&categoria=frango_de_corte. Acesso em: 03 abr. 2006.

MILTEMBURG, G. Promotores e aditivos de crescimento em Avicultura. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. p. 204-215.

MITCHELL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; McEWEN, S. A.; McNAB, W. B.; IEE, J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61; n. 6, p. 742-756, 1998.

MYLLYNIEMI, A. L. **Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat**. 2004. 87 p. Academic dissertation (Food and Environmental Hygiene) - Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of rabbits**. 2. ed. Washington: National Academy Press, 1977. 30 p.

NOUWS, J. F. M. Irritation, bioavailability, and residue aspects of ten oxytetracycline formulations administered intramuscularly to pigs. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 6, p. 80-84, 1984.

NUNES, G. S. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 462-471, 2005.

OLIVEIRA, M. R. V. **O Brasil está preparado para a segurança biológica na agricultura?** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=176>. Acesso em: 24 abr. 2006b.

OLIVEIRA, M. R. V. **Questões sanitárias e o agronegócio brasileiro**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=631>. Acesso em: 24 abr. 2006a.

PADILHA, T. **Resistência antimicrobiana x produção animal**: uma discussão internacional. Brasília: Embrapa Produção de Informação, 2000. Disponível em: http://www21.sede.embrapa.br/noticias/artigos/2000/artigo.2004-12-07.2546062632/mostra_artigo. Acesso em: 21 jul. 2005.

PALERMO-NETO, J. Fatos sobre legislação e uso de antibióticos como aditivos em rações. **Avicultura Industrial**, São Paulo. Disponível em: http://aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?tipo_tabela=cet&id=12425&categoria=nutricao. Acesso em: 23 maio 2006.

PALERMO-NETO, J. Resíduos de antimicrobianos em alimentos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 7, n. 22, p. 65-71, 2001.

PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. de S.; GÓRNIAC, S. L. Introdução. In: _____. **Farmacologia aplicada a avicultura**: Boas práticas no manejo de medicamentos. São Paulo: ROCCA, 2005.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Programa de Análise de Resíduos de Drogas Veterinárias em Alimentos**. Curitiba: Secretaria de Estado da Saúde, DVSA, 2003b.

PARANÁ. Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Perfil da Agropecuária Paranaense**. Curitiba: Secretaria de Estado da Saúde, DERAL, 2003a.

PERIN, L.; da SILVA, E. E.; REIS, V. M. **Produção e caracterização dos antissoros policlonais contra bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Gluconacetobacter spp.* e *Herbaspirillum spp.*** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 40 p. (Documentos, 149).

PESSANHA, R. P.; GONTIJO FILHO, P. P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa de microflora fecal de frangos de corte. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 53, n. 1, p. 111-115, 2001.

PONTES NETTO, D.; LOPES, M. O.; DE OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; JUNIOR, M. M.; LAZARETTI, S. B.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L. DE C.; FILHO, D. V.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

RAIA, R. B. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite**. 2001. 78 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RAO, G. S.; RAMESH, S.; AHMAD, A. H.; TRIATHI, H. C.; SHARMA, L. D.; MALIK, J. K. Pharmacokinetics of Enrofloxacin and its Metabolite Ciprofloxacin in Goats given Enrofloxacin Alone and in Combination with Probenecid. **The Veterinary Journal**, London, v. 163, p. 85–93, 2002.

RIEDL, M. A.; CASILLAS, A. M. Adverse drug reactions: types and treatment options. **American Family Physician**, Kansas City, v. 68, p. 1781-1790, 2003.

ROSE, M. D.; BYGRAVE, J.; STUBBINGS, G. W. Extension of multi-residue methodology to include the determination of quinolones in foods. **The Analyst**, London, v. 123, n. 12, p. 2789-2796, 1998.

ROYBAL, J. E.; PFENNING, A. P.; TURNIPSEED, S. B.; WALKER, C. C.; HURLBUT, J. A. Determination of four fluoroquinolone in milk by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 780, p. 83-92, 2002.

SADER, H. Quinolonas: avanços e conquistas clinicamente relevantes. Bristol-Myers Squibb, 1999. Disponível em: <http://www.bristol.com.br/medicos/infocientifica/0/jornalquinolonas1.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2005.

SAMANIDOU, V. F.; CHRISTODOULOU, E. A.; PAPADOYANNIS, I. N. Direct determination of five fluoroquinolones in chicken whole blood and in veterinary drugs by HPLC. **Journal of Separation Science**, New York, v. 28, p. 325–331, 2005.

SAMSONOVA, J. V.; BASHKUROV, M. L.; IVANOVA, N. L.; RUBTSOVA, M. Y.; EGOROV, A. M. ELISA of streptomycin in buffer and milk: Effect of reagents stricture and analysis format assay performance. **Food and Agricultural Immunology**. London, v. 16, p. 47-57, 2005.

SANTOS, I.C.; DE SOUSA, R.V.; SANTANA, G. C. Princípios da antibioticoterapia em medicina veterinária. **Boletim Agropecuário**, Lavras, n.38.http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_38.pdf. Acesso em: 21 jul. 2005.

SEVERO, M. P. F. Resíduos em produtos de origem animal no Brasil: o papel do Ministério da Agricultura e Abastecimento. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, Piracicaba, 1999. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1999. p. 31-44.

SHIMER, G. D.; STANKER, L. H.; ELISSALDE, M. H.; BIRD, C. B.; DIXON, D. E.; RICHARDS, M. C.; LEDDEN, D. J.; MILLER, B. M. Immunochemical detection of the anticoccidial Salinomycin in poultry feed. In: BEIER, R. C.; STANKER, L. H. **Immunoassays for residue analysis**: food safety. Washington: American Chemistry Society, 1996. chap. 8. (ACS Symposium Series, 621).

SMITH, K. E.; BESSER, J. M.; HEDBERG, C. W.; LEANO, F. E. T.; BENDER, J. B.; WICKLUND, J. H.; JOHNSON, B. P.; MOORE, K. A.; OSTERHOLM, M. T. Quinolone resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 340, n. 20, p. 1525-1532, 1999.

SOUZA, M. V. N.; DE ALMEIDA, M. V.; DA SILVA, A. D.; COURI, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante fluoroquinolona no combate ao antraz. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2004.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol e análogos. In: H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 333-336.

THAKENOUCI, T.; ISHII, C.; SUGAWARA, M.; TOKUE, Y.; OHYA S. Incidence of various gyr A mutants in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 39, p. 1414-1418, 1995.

THE MERCK VETERINARY MANUAL. Quinolones. Whitehouse Station: Merck & Co., 2006. p. 1761-1765. Disponível em: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/191235.htm>. Acesso em: 04 maio 2006.

TRIONE, E. J. The use of monoclonal antibodies in plant pathology. In: HESS, W. M.; SINGH, R. S.; SINGH, U. S.; WEBER, D. J. **Experimental and conceptual plant pathology**. New York: Gordon & Breach Science, 1998. chap. 2, p.33-43.

WATANABE, H.; SATAKE, A.; KIDO, Y.; TSUJI, A. Monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. **The Analyst**, London, v. 127, p. 98-103, 2001.

WATANABE, H.; SATAKE, A.; MATSUMOTO, M.; KIDO, Y.; TSUJI, A.; ITO, K.; MAEDA, M. Monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for monensin. **The Analyst**, London, v. 123, n. 12, p. 2573-2578, 1998.

WILSON, M. B.; NAKANE, P. K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish (HRPO) to antibodies. In: KNAPP, W.; HOLUNBAR, K.; WICK, G.

Immunofluorescence and related staining techniques. Amsterdam: Elsevier, 1978. p. 215-224.

WRIGHT, D. H.; BROWN, G. H.; PETERSON, M. L.; ROTSCHAFER, J. C. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 46, p. 669–683, 2000.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, London, v. 184, p. 1648-1649, 1959.

ZHANEL, G. G.; KARLOWSKY, J. A.; SAUNDERS, M. H.; DAVIDSON, R. J.; HANCOCK, R. E. W.; MCLEAN, I.; NICOLLE, L. E. Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 39, p. 489-495, 1995.

ZOCCAL, R. **O leite de que o Brasil precisa.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/jornaleite/artigo.php?id=11>. Acesso em: 02 maio 2006.