

ELISA PARA SEGURANÇA ALIMENTAR DO AGRONEGÓCIO

Keila Maria Roncato Duarte

Eng. Agra., Dra., PqC da APTA Regional de Tietê

kmrduarte@sp.gov.br

A segurança alimentar tem sido um grande tema para direcionar nossas pesquisas aplicadas ao agronegócio. Com o refinamento do consumo, hoje exigindo e pagando por alimentos de melhor qualidade, alimentos com rastreabilidade na origem, alimentos nutracêuticos, alimentos livres de alergênicos, orgânicos, veganos, transgênicos, etc, bem como alimentos com garantia de genética e propriedades desejadas, nos deparamos com desafios de colocar esses alimentos na mesa do consumidor e mais importante, garantir tais características.

Existem muitas metodologias que podem ser utilizadas para identificar essas características, dentre elas o teste de ELISA ou imunoenensaio enzimático em suporte sólido. O teste de ELISA, traduzido do inglês como Teste imunoenzimático em suporte sólido é baseado na reação antígeno –anticorpo, resultando numa reação enzimática, que gera cor ao final do ensaio. A detecção pode ser do antígeno ou dos anticorpos presentes (Duarte et al, 2006).

Existem variáveis do teste, que são classificadas de acordo com a ordem em que são colocados os reagentes. Desta forma, em testes do tipo PTA (Plate Trapped Antigen) ou sanduiche, quanto mais cor, mais positivo é a amostra. Já em testes de competição, o que representa a maioria dos kits comerciais, o resultado é inversamente proporcional, ou seja, quanto mais colorido, mais negativo é a amostra.

Dentre as vantagens do ELISA sobre outros procedimentos, estão: o custo/benefício; a rapidez do teste (os resultados podem ser apresentados de 10 minutos a 3 horas, dependendo do teste) (Figura 1); a quantidade de amostras necessária, que varia de 1 a 50

ul; a grande quantidade de amostras que podem ser realizadas no tempo, por exemplo, pode-se fazer cerca de 20 placas no dia, ou seja, cerca de 2000 amostras.

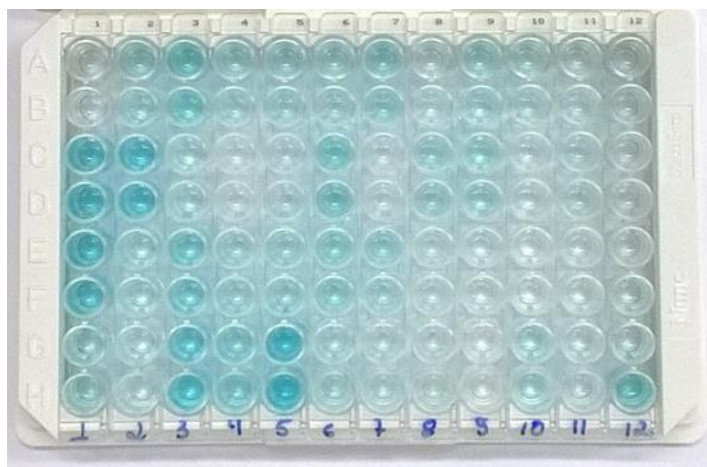


Figura 1 – Placa de ELISA com Teste Visual rápido para diagnóstico de gestação (IDEXX Ltda) onde os poços azuis representam ovelhas gestantes, com 30 dias após inseminação. Esse teste é realizado em 45 minutos. Fonte: Pessoal

Aplicações

A indústria de kit de ELISA hoje gira milhões de dólares anuais. Citarei aqui alguns exemplos, com os quais tive oportunidade de trabalhar ou acompanhar trabalhos realizados. Na área de produção animal, a exemplo da figura 1, é possível fazer o diagnóstico de gestação de bovinos com 28 dias e de ovinos com 30 dias, em 45 minutos, sem a necessidade de equipamentos ou laboratório. Na qualidade de carne, há proteínas que podem ser identificadas, atestando níveis de maciez/marmorização ; no leite, pode se quantificar beta-caseína, alergênicos, selênio, etc. Na área de doenças de plantas, por exemplo, a indústria de kits é a mais desenvolvida, tendo disponíveis no mercado kits para diagnóstico de mais de 1000 doenças, causadas por vírus, fungos, bactérias e outros agentes etiológicos, o que garante a qualidade de alimentos, flores e sementes.

A identificação de proteínas transgênicas na soja, milho, algodão, por exemplo, são realizadas no mundo todo por uma variação do ELISA, apresentado em “Strips”, ou seja, fitas semelhantes aos testes de gravidez e que compõe a reação antígeno-anticorpo para identificação dos transgênicos. Existem testes assim para todos eventos transgênicos comercializados e trabalhos no sentido de facilitar a identificação das proteínas oriundas dos genes, como no caso do milho, trabalho realizado por pesquisadores da APTA Regional, dos quais fiz parte (Neto et al, 2016).

Para as doenças de animais de produção ou de companhia, há uma infinidade de testes, seja de ELISA, ou de suas variações, como imunolocalização, que são usados em algumas

doenças como testes confirmatórios, onde o anticorpo é revelado com um a fluoresceína e não uma enzima (Figura 2).

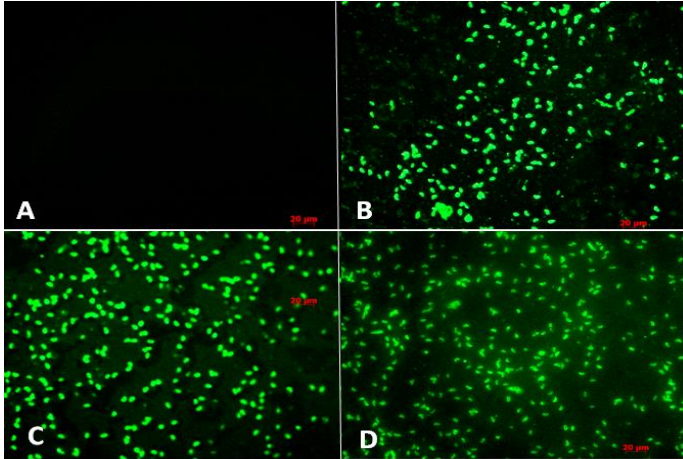


Figura 2 – Teste para confirmação de toxoplasmose em ovinos com imunofluorescência. Os bradizoitos (*Toxoplasma gondii*) aparecem fluorescentes na amostra de sangue. Fonte: Duarte et al., 2020.

Os alergênicos também podem ser todos identificados por ELISA, como glúten, amendoim, soja, castanhas diversas, ovo,

leite, látex, etc.

Na área de resíduos, sejam eles de antibióticos, agroquímicos, metais pesados, anabolizantes, promotores de crescimento, etc há kits de ELISA disponíveis para quaisquer moléculas, para identificação em ração, carne, ovos, leite, mel, insetos, em diferentes matrizes como sangue, pelos, unhas, saliva, urina e fezes. Esse mercado encontra-se sempre em crescimento exponencial (Figura 3).

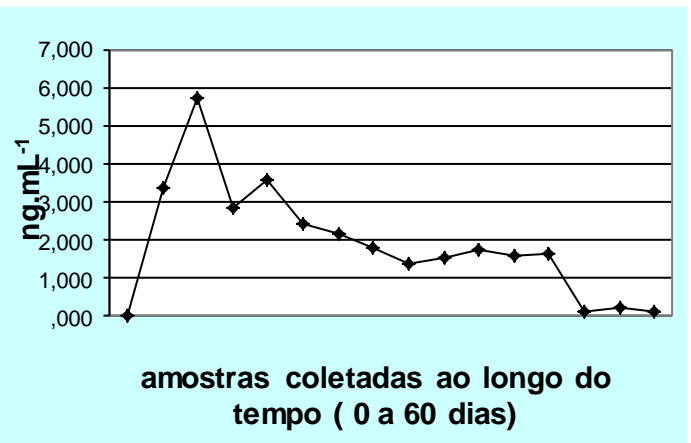


Figura 3 – Dispositivo para coleta de urina. Gráfico de quantificação, por ELISA de Acetato de Trembolona (TBA) presente na urina de bezerros, ao longo do tempo. Fonte: Duarte et al, 2006.

O ELISA é aceito como teste em quarentenas e tem acreditação internacional. Hoje o mercado exige que os produtos tenham atestado de livre de resíduos. O MAPA, juntamente com a ANVISA, têm trabalhado para identificar resíduos de antibióticos, herbicidas, anabolizantes, entre outros na carcaça de animais abatidos. Nosso desafio como pesquisadores é desenvolver metodologias, com mostrada na Figura 3, para determinação de resíduos antes do abate, permitindo assim que o animal cumpra a carência e a carcaça não seja descartada.

Para qualidade de alimentos, podemos ainda diferenciar cultivares baseado na aptidão, por exemplo, proteínas do trigo que diferenciam cultivares apta a indústria de massas, outras para indústria de pães. O mesmo acontece com variedades de batata, aptas a fritura, a purê, etc

Compostos secundários também podem ser identificados e quantificados por ELISA, agregando valor a alimentos e possibilitando outros usos, na indústria cosmética e farmacêutica, como alimentos funcionais, como suplementos. Por exemplo, quantificação de níveis de isoflavona em soja e outras leguminosas, composto secundário de grande uso e valor elevado na indústria farmacêutica como substituto do estrogênio. Neste sentido, trabalhos para quantificar a quantidade de isoflavona na soja tem sido realizados, com anticorpos produzidos (Farias et al, 2012), de forma a classificar variedades de soja cultivadas no estado de São Paulo.

Finalizando, na área de fisiologia e bem-estar animal, temos pesquisado e utilizado os ELISAs para aprimorar os programas de Inseminação Artificial, quantificando os hormônios e assim intervindo de forma mais individualizada, evitando a utilização em excesso destes hormônios e garantindo a saúde das fêmeas; quantificando substâncias ligadas ao estresse, como cortisol, corticosterona, histamina, grelina, leptina, entre outras, de forma a identificar melhores formas de manejo, contribuindo para o bem-estar do animal e conseqüentemente, aumentando o preço pago pela carne. Animais com pouco estresse durante a produção e abate, tem maior ganho de peso, carne mais macia, menores perdas por luxação, menores perdas devido a ecto e endo parasitas, além de permitir o acompanhamento hormonal de fêmeas. Assim, nesta área, o ELISA constitui uma ferramenta para medir e assim permitir ajustar as melhores condições de manejo.

Considerações finais

Os Testes ELISA constituem numa ferramenta extremamente prática e eficiente em toda cadeia produtiva de alimentos, garantindo qualidade, agregando valor, bem-estar e segurança alimentar sendo, portanto, grandes aliados no desenvolvimento e qualidade agregada ao agronegócio.

Referências

[DUARTE, K. M. R.](#); [GOMES, L.H.](#); [PASCHOAL, J.A.R.](#); [MEIRELLES, C. F.](#) . **A fast immunoassay for the screening of alfa-trembolone in bovine urine**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 43, p. 74-79, 2006.

DUARTE< K.M.R., MACHADO, D.C., COSTA, R.L.D., CHAVES, C.M.S. . **Sheep toxoplasmosis diagnose by ELISA and IFAT**. Brazilian Journal of Animal and Environmental research, v. 3, p. 2128-2139, 2020.

DUARTE K.M.R., PASCHOAL J.A.R., GOMES L.H. **Imunoensaios e Zootecnia: Aplicações práticas**. Boletim de Industria Animal, v. 63,p. 84-92.

FARIAS, J. F. ; DUARTE, K. M. R. ; [GOMES, L.H.](#) ; PESSOA, F.F. ; MELLO, A.F. ; SAVISKY, J.A.P. **Polyclonal antibodies against isoflavones: fast screening method for Forage legume species**. The IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR), v. 2, p. 537-539, 2012.

NETO, G. BALIEIRO; FREITAS, A. W. P.; FERRAZ BRANCO, R. B.; DUARTE, K.M.R. ; PELA, F. PORTO ; BARUFFI, M. D. 0639 **WS Immunodetection of the Cry toxin in leaves of transgenic maize hybrids**. Journal of Animal Science, v. 94, p. 305, 2016.