



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LÍVIA MONTANHEIRO MÉDICI

**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B1:
APLICAÇÃO EM IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO,
IMUNOFLUORESCÊNCIA IN SITU E ESTUDO DA
TOXICIDADE EM EMBRIÃO DE FRANGO**

LÍVIA MONTANHEIRO MÉDICI

**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B1:
APLICAÇÃO EM IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO,
IMUNOFLUORESCÊNCIA IN SITU E ESTUDO DA
TOXICIDADE EM EMBRIÃO DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Médici, Livia Montanheiro .

Anticorpo monoclonal anti-aflatoxina B1: : aplicação em imunoensaio enzimático, imunofluorescência in situ e estudo da toxicidade em embrião de frango / Livia Montanheiro Médici. - Londrina, 2016.
98 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Aflatoxina - Tese. 2. Micotoxinas - Tese. 3. Carne de ave - Tese. 4. Anticorpos monoclonais - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

LÍVIA MONTANHEIRO MÉDICI

**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B1:
APLICAÇÃO EM IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO,
IMUNOFLUORESCÊNCIA IN SITU E ESTUDO DA TOXICIDADE EM
EMBRIÃO DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Jaqueline Garda-Bufferon
Universidade Federal do Rio Grande – UFRG

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 12 de maio de 2016

*Ao meu amado Deus, por me mostrar o
verdadeiro caminho e me dar força para chegar até aqui;
Aos meus pais José Roberto e Leonice, e
minha irmã Bruna, por todo amor,
compreensão e por acreditarem na minha capacidade;
Ao meu querido esposo Guilherme, por todo
amor, carinho, paciência e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, conhecimento repassado, incentivo, apoio e compreensão;

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos por todo aprendizado e incentivo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro – Projeto n. 23, Rede Nanobiotec-Brasil;

Ao Dr. Osamu Kawamura de Kagawa University, Japão, pelo fornecimento de hibridomas e por todo conhecimento técnico repassado ao grupo de pesquisa;

Aos professores Dra. Eiko Nakagawa Itano, Dr. Selwyn Headley, Prof. Dra. Ana Paula Bracarense e Dr. Eduardo Araujo pelo conhecimento repassado, orientações e contribuição para o trabalho;

Às doutoras Angélica Ishikawa e Cássia Takabayashi Yamashita pela amizade, companheirismo, ensinamento e auxílio no cultivo de hibridomas, padronização de imunoensaio e experimento com animais;

À Ana Lúcia Felício de Souza e Leonardo Maciel pela amizade, companheirismo e ensinamento em cromatografia;

À Fernanda Ramos e Thais Marques pela ajuda nas análises, apoio e amizade;

Aos colegas de laboratório Tatiana Ávila Miguel, Gervásio Saito, André Ribeiro, Felipe Fracalossi e aos estagiários, João Gabriel Ferreira, Gustavo Brugnaró, Luís Felipe Morozzini e Cátia Yokoyama pela ajuda nas análises e pelos momentos de descontração;

Aos técnicos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos Patrícia, Alessandra, Rubens e Neuza pela dedicação e apoio;

À Dra. Kerlei Cristina Médici, ao técnico Sérgio Martins e a mestrande Thalita de Oliveira do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por toda ajuda e conhecimento repassado nos experimentos com animais e análise histológica;

À Dra. Paula Leonello e ao técnico Nilson do Departamento de Ciências Patológicas pelo apoio e contribuição nas análises de imuno-histoquímica e histologia; 5

Ao técnico João Pereira do Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária pelo auxílio no uso do micrótomo;

Ao Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo auxílio no preparo de material para histologia e imuno-histoquímica;

Ao Departamento de Estatística pelo auxílio na análise de dados;

Aos meus pais Leonice e José Roberto, irmã Bruna, esposo Guilherme, sogros Sirlene e Clóvis, e tios Claudio e Kerlei por toda compreensão, amor, apoio e carinho;

Aos amigos e colegas do departamento pelos momentos de descontração, ajuda e amizade;

Aos meus queridos amigos de infância, faculdade e grupo de oração por permanecerem ao meu lado e acreditarem nas minhas conquistas.

LÍVIA MONTANHEIRO MÉDICI. **Anticorpo monoclonal anti-aflatoxina B1: aplicação em imunoensaio enzimático, imunofluorescência *in situ* e estudo da toxicidade em embrião de frango.** 2016. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O Brasil é líder mundial em exportação de carne de frango e o segundo maior produtor, a garantia da saúde e produção animal é essencial na manutenção de posição destaque perante economia nacional e mundial. As aflatoxinas (AF), metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, constituem ameaça por contaminar alimentos e rações e causar efeitos tóxicos e carcinogênicos em humanos e animais. A imun química se destaca na análise de micotoxinas pela sensibilidade, confiabilidade e simplicidade, a exemplo de ensaio imunoenzimático ic-ELISA para quantificação e imunofluorescência na detecção tecidual. Com enfoque no desenvolvimento de métodos imun químicos, anticorpo monoclonal (AcM) antiaflatoxina foi produzido *in vitro*, cultivando hibridoma linhagem AF4 em meio RPMI + 50% de soro fetal bovino (SFB), seguido de adaptação gradual ao meio H-SFM, obtendo-se total de 508,6 mg de anticorpo purificado. O AcM diluído ao título de 1:10.000 permitiu quantificação de AFB₁ em fígado de frango por ic-ELISA. Na validação intralaboratorial do ic-ELISA, a interferência de matriz não contaminada (fígado), foi avaliada no fator de diluição entre 2 a 15, sendo a diluição 5x escolhida pelo menor CV (14%) e melhor recuperação (100%). Em seguida, as curvas padrão na ausência e presença da matriz foram comparadas pela porcentagem de ligação de cinco pontos (0,05 ng/mL a 5,0 ng/mL), não obtendo diferença significativa ($p > 0,05$). A curva padrão de AFB₁ demonstrou linearidade adequada, expressa pela equação de regressão $y = -13,34 \ln(x) + 50,352$ e R² de 0,9917 ($p < 0,05$). As taxas de recuperação foram 90,5; 91,3 e 81,3% para 1,5; 3,0 e 5,0 ng/g, respectivamente. A precisão do método foi avaliada por repetibilidade (CV de 3,8; 4,6 e 4,0% para 1,5; 3,0 e 5,0 ng/g) e precisão intermediária (CV de 4,7; 7,0 e 5,0% para 1,5; 3,0 e 5,0 ng/g), estando todos os valores dentro dos limites preconizados pelas agências reguladoras. A robustez foi avaliada pela troca de analistas, instrumento (micropipeta) e tempo de sensibilização (18 e 24 h) da placa; o CV foi de 4 a 8% para sete curvas padrão realizadas por analistas diferentes, o CV médio obtido pela troca de instrumento e tempo de sensibilização foi de 5,2%, garantindo robustez para as três variáveis testadas. O limite de detecção foi de 1,2 ng/g e limite de quantificação de 1,5 ng/g. O AcM, ao título de 1:100, foi também aplicado na detecção direta de AFB₁ em tecido hepático de embrião de frango por imunohistoquímica colorimétrica (DAB-diaminobenzidina) e imunofluorescência (FICT-*Fluorescein Isothiocyanate*). Análise macroscópica, histológica e imunohistoquímica foram conduzidas em quatro grupos experimentais, sendo G1: sem tratamento; G2: controle negativo da solução veículo (50% DMSO: 50% H₂O); G3: 50 ng AFB₁ /ovo e G4: 1 µg AFB₁ /ovo, injetados via saco de gema. Após 24 h de exposição, os embriões foram eutanaziados para análise (taxa de sobrevivência de 85,7%; 42,9%; 28,6% e 0% para os grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente). Não houve diferença significativa no tamanho dos órgãos entre os grupos ($p > 0,05$). As lesões macroscópicas evidentes nos grupos tratados com AFB₁ foram hemorragia no coração (42,9% no G4; 28,6% no G3; 14,3% no G2 e sem observações no G1) e pulmão (57,1% no G4; 42,9% no G3 e sem observações no G2 e G1). Fígado e rins hemorrágicos foram evidenciados com maior frequência nos grupos tratados e controle (71,4% no G4 e G3; 42,9% no G2 e 14,3% no G1, para fígado; e 57,1% no G4, G3 e G2 e 14,3% no G1, para rim), visto que o veículo DMSO também apresentou toxidez contra os embriões. Órgãos friáveis,

que caracterizam os primeiros sinais de aflatoxicose, foram evidenciados no G4 (57,1%) e G3 (42,8%), mas não nos grupos controle. Na análise histológica, não houve diferença significativa no escore lesional total hepático entre os grupos G2, G3 e G4 (escore de 13,9; 14,1 e 16,3, respectivamente; $p > 0,05$), mas estes grupos diferiram em relação ao G1 (escore de 3,1; $p < 0,05$). A presença de dissociação dos hepatócitos, necrose e inflamação aleatória foram expressivas nos grupos tratados com AFB₁ e DMSO, não sendo detectadas no G1. Na imunohistoquímica, ambas as técnicas colorimétrica e fluorescente foram capazes de detectar AFB₁ no tecido, sendo que a imunofluorescência permitiu a visualização definida da marcação da toxina nos hepatócitos, se comparada à colorimétrica, que marcou toda a extensão dos hepatócitos com deposição do DAB. A produção ilimitada de AcM permitiu desenvolver imunoenensaio ic-ELISA com custo 160 vezes inferior aos kits comerciais, assim como permitiu a detecção direta de toxina no tecido, mostrando-se promissor para triagem de AFB₁ em fígado de frango e no diagnóstico de aflatoxicoses.

Palavras-chave: ic-ELISA. Validação. Imuno-histoquímica. Aflatoxicose.

LÍVIA MONTANHEIRO MÉDICI. **Monoclonal antibody anti-aflatoxin B1: application in enzyme immunoassay, immunofluorescence *in situ* and study of toxicity in chicken embryo.** 2016. 98p. Dissertation (Masters in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Brazil is the world's leading exporter of chicken meat and second main producer, ensuring animal health and production is essential to maintain this leading position in the national and world economy. Aflatoxins (AF), secondary metabolites produced by fungi of the genus *Aspergillus*, are a threat in order to contaminate food and feed and cause toxic and carcinogenic effects in humans and animals. Immunochemistry stands out in the analyses of mycotoxins, due to its sensitivity, reliability and simplicity, as ic-ELISA immunoassay to quantify and immunofluorescence for detection in tissue. Focusing on development of immunochemical methods, monoclonal antibody (mAb) anti-aflatoxin was produced *in vitro*, by the cultivation of hybridoma lineage AF4 in RPMI medium + 50% fetal bovine serum (FBS), followed by gradual adaptation to the H-SFM medium, resulting in a total of 508.6 mg of purified antibody. The MAb diluted to a titer of 1: 10,000 allowed quantitation of AFB₁ in chicken liver by ic-ELISA. Intralaboratorial validation of ic-ELISA was carried out by analysis of interference of uncontaminated matrix (liver), in a dilution factor from 2 to 15, the dilution 5x was selected because of the lowest CV (14%) and better recovery (100%). Then, the standard curves in the absence and presence of the matrix were compared by the percentage of binding of five points (0.05 ng/mL to 5.0 ng/mL), there was no significant difference between them ($p > 0,05$). The AFB₁ standard curve showed adequate linearity, expressed by regression equation $y = -13.34 \ln(x) + 50.352$ and R² equal to 0.9917 ($p < 0.05$). The recovery rates were 90.5; 91.3 and 81.3% for 1.5; 3.0 and 5.0 ng/g, respectively. Precision was evaluated by repeatability (CV of 3.8; 4.6 and 4.0% for 1.5; 3.0 and 5.0 ng/g), and intermediate precision (CV of 4.7; 7.0 and 5.0% for 1.5; 3.0 and 5.0 ng/g), the values found in this work are within the limits recommended by regulatory agencies. The robustness was evaluated by exchanging analysts, instrument (micropipette) and coating time (18 and 24 hours); CV ranged from 4 to 8% for seven curves performed by different analysts, the mean value of CV obtained by the exchange of instrument and coating time was 5.2%, ensuring robustness for the three variables tested. Limit of detection was 1.2 ng/g, and limit of quantitation was 1.5 ng/g. Mab was also applied for direct detection of AFB₁ in liver tissue of chicken embryo, at a titer of 1: 100, by colorimetric immunohistochemistry (DAB-diaminobenzidine) and immunofluorescence (FITC-Fluorescein Isothiocyanate). Macroscopic, histological and immunohistochemical analysis were conducted in four groups, defined as: G1: no treatment; G2: negative control of vehicle solution (50% DMSO: 50% H₂O); G3: 50 ng AFB₁ /egg and G4: 1 µg AFB₁ /egg, injected via yolk sac. After 24 hours of exposure, the embryos were sacrificed for analysis, the survival rate was 85.7%; 42.9%; 28.6% and 0% for the groups G1, G2, G3 and G4, respectively. There was no significant difference in the size of organs between the groups ($p > 0.05$). The evident macroscopic lesions in the groups treated with AFB₁ were heart hemorrhage (42.9% in G4, 28.6% in G3, 14.3% in group 2 and no observations in G1) and lung hemorrhage (57.1% in G4, 42.9% in G3 and no observations in G2 and G1). Hemorrhage in liver and kidney were evidenced more frequently in treated and control groups (71.4% in G4 and G3, 42.9% in G2 and 14.3% in G1, for liver; and 57.1% in G4, G3 and G2 and 14.3% in G1, for kidney), since dimethylsulfoxide (DMSO), used as a vehicle solution, also showed toxicity against embryos. Friable organs,

that characterize the first aflatoxicosis signals, were observed in the G4 (57.1%) and G3 (42.8%), and not observed in control groups. At the histological analysis, there was no significant difference in total lesion score of the liver between G2, G3 and G4 (score of 13.9, 14.1 and 16.3, respectively; $p > 0.05$), but there was difference of these groups compared to G1 (score 3.1; $p < 0.05$). The presence of dissociation of hepatocytes, necrosis and inflammation areas were expressive in the groups treated with AFB₁ and DMSO, not being detected in G1. In immunohistochemistry, both colorimetric and fluorescent techniques were able to detect AFB₁ in tissue, immunofluorescence allowed defined visualization of the toxin in hepatocytes, compared to colorimetric, that has marked the whole extension of hepatocytes by deposition of DAB. The unlimited production of mAb allowed the development of immunoassay ic-ELISA with cost around 160 times lower than commercial kits, and allowed the direct detection of toxin in tissue, proving to be promising in the application for AFB₁ screening in chicken liver and diagnosis of aflatoxicosis.

Keywords: ic-ELISA. Validation. Immunohistochemistry. Aflatoxicosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Composição centesimal e valor calórico (kcal/100g) em aves	20
Figura 2 – Estrutura das aflatoxinas e seus metabólitos	24
Figura 3 – Metabolismo principal da Aflatoxina B1	25
Figura 4 – Resultado da média de aflatoxina em milho, no período de jan/2012 a mar/2013.....	27
Figura 5 – Metabolização da AFB1 em aves.....	28
Figura 6 – Representação esquemática do sistema avidina-biotina-peroxidase.....	35
Figura 7 – Estrutura geral da molécula de IgG.....	38
Figura 8 – Fluxograma de delineamento experimental total	41
Figura 9 – Metabolização da AFB1 em aves.....	42
Figura 10 – Otimização de AcM anti-AFB1 e conjugado anti-IgG-HRP por i-ELISA	43
Figura 11 – Padronização ic-ELISA: curva de calibração e interferência da matriz (especificidade)	44
Figura 12 – Extração de AF na matriz alimentar.....	45
Figura 13 – Validação intralaboratorial de ic-ELISA para análise de AFB1 em fígado de frango (1INMETRO, 2007; 2 CE nº 401/2006, 2006 e 3ANVISA, 2003)	46
Figura 14 – Fase experimental conduzida com embriões de frango	47
Figura 15 – Imuno-histoquímica colorimétrica e fluorescente.....	48

CAPÍTULO I

Figura 1 – Perfil eletroforético pós-diálise de AcM IgG anti-AFB1 em SDS-PAGE.....	62
Figura 2 – Perfil do título de AcM anti-AFB1 e conjugado anti-IgG-HRP	63
Figura 3 – Interferência da matriz em ic-ELISA para determinação de AFB1 em fígado de frango	66
Figura 4 – Análise de desvios entre curva padrão e matrizada para determinação de AFB1 em fígado de frango.....	67
Figura 5 – Curva padrão para detecção de AFB1 por ic-ELISA.....	11

CAPÍTULO II

Figura 1 – Alterações Macroscópicas observadas nos grupos controle e tratados com AFB1	80
Figura 2 – Hemorragia observada nos embriões	80
Figura 3 – Escore lesional hepático total causado por AFB1 e DMSO em embrião de frango.....	81
Figura 4 – Escore das principais lesões hepáticas causadas por AFB1 e DMSO em embrião de frango.....	82
Figura 5 – Lesões hepáticas causadas por aflatoxina B1 e DMSO em embrião de frango	83
Figura 6 – Detecção de AFB1 em fígado de embrião de frango por imunohistoquímica colorimétrica.....	85
Figura 7 – Detecção de AFB1 em fígado de embrião de frango por imunofluorescência	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos de dietas contaminadas com aflatoxina em galinhas poedeiras	31
Tabela 2 – Média de AFB1 em ovos durante 60 dias de exposição de galinhas poedeiras a diferentes níveis de aflatoxina na ração (µg/kg)	31

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Reatividade cruzada de AcM produzido pelo hibridoma AF4.....	61
Tabela 2 – Otimização do procedimento de ic-ELISA	63
Tabela 3 – Comparação de valores entre ic-ELISA desenvolvido e Kit comercial	64
Tabela 4 – Teste de extração de AFB1 em fígado de frango	64
Tabela 5 – Recuperação de AFB1 em amostras de fígado de frango por ic-ELISA.....	68
Tabela 6 – Análise de precisão conduzida para determinação de AFB1 em fígado de frango por ic-ELISA	69

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Estabelecimento de escore para avaliar lesão histológica em fígado.....	78
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
Ac	Anticorpo
AcM	Anticorpo Monoclonal
AF	Aflatoxina
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFQ1	Aflatoxina Q1
AFM1	Aflatoxina M1
AFP1	Aflatoxina P1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists International</i>
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina de soro bovino
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIA	Coluna de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAB	Compania Nacional de Abastecimento
CV	Coefficiente de variação
DAB	Diaminobenzidina
DL50	Dose Letal 50
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EC	<i>Europe Commission</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	<i>Food Agriculture and Organization of the United Nations</i>
FICT	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona S-Transferase
HE	Hematoxilina/Eosina 14

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
H-SFM	<i>Hybridoma-Serum free medium</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC50	<i>Inhibition Concentration at 50%</i>
ic-ELISA	<i>Indirect Competitive Enzyme Linked Immuno Assay</i>
IgG	Imunoglobulina G
LD	Limite de detecção
LMT	Limite Máximo Tolerado
LQ	Limite de quantificação
MNNG	N-Methyl-N7-nitro-N-nitrosoguanidina
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
OVA	Ovoalbumina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio – Tween
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-Gel de Poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	AVICULTURA BRASILEIRA	19
2.2	MICOTOXINAS	22
2.2.1	Aflatoxina	23
2.2.1.1	Aflatoxina em aves	26
2.3	MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICOTOXINAS	31
2.3.1	Métodos Cromatográficos	31
2.3.2	Métodos Imunológicos	33
2.4	PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL	37
3	OBJETIVO	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
CAPÍTULO I	Anticorpo monoclonal antiaflatoxina B₁ em ic-ELISA aplicado a material biológico	50
1	INTRODUÇÃO	53
2	MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1	MATERIAIS	54
2.2	MÉTODOS	55
2.2.1	Cultivo de hibridoma e produção de AcM específico para aflatoxina	55
2.2.1.1	Manutenção e recuperação de hibridoma	55
2.2.1.2	Produção de AcM IgG em meio sintético <i>Hybridoma-SFM</i>	55
2.2.1.3	Determinação de proteína (IgG)	56

2.2.1.4	Determinação de reatividade antimicotoxina por i-ELISA	56
2.2.2	Purificação de anticorpo monoclonal IgG anti-AFB ₁	56
2.2.2.1	Precipitação com sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	56
2.2.2.2	Diálise de proteína	57
2.2.2.3	Eletroforese em SDS-PAGE.....	57
2.2.3	ELISA competitivo indireto (ic-ELISA)	57
2.2.3.1	Otimização de AcM anti-AFB ₁ e conjugado anti-IgG-HRP.....	57
2.2.3.2	Procedimento	57
2.2.3.3	Extração de AF na matriz alimentar	58
2.2.4	Validação intralaboratorial de ic-ELISA para quantificação de AFB ₁	58
2.2.4.1	Exatidão	58
2.2.4.2	Precisão.....	59
2.2.4.3	Linearidade	59
2.2.4.4	Especificidade.....	59
2.2.4.5	Robustez	60
2.2.4.6	Limite de detecção e quantificação.....	60
2.2.5	Análise estatística	60
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1	PRODUÇÃO DE ACM ANTI-AFB ₁ ATRAVÉS DE CULTIVO DE HIBRIDOMA AF4	60
3.2	OTIMIZAÇÃO DE ACM ANTI-AFB ₁ E CONJUGADO ANTI-IGG-HRP POR I-ELISA	62
3.3	PROCEDIMENTO IC-ELISA	63
3.4	EXTRAÇÃO DE AF NA MATRIZ ALIMENTAR.....	64
3.5	VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE IC-ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AFB ₁ EM FÍGADO DE FRANGO	65
4	CONCLUSÃO.....	70
CAPÍTULO II	Aflatoxina B₁: imunofluorescência <i>in situ</i> e toxicidade em embrião de frango	71
1	INTRODUÇÃO	74

2	MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1	MATERIAIS	75
2.2	MÉTODOS	76
2.2.1	Produção de AcM específico para aflatoxina	76
2.2.2	Delineamento Experimental	76
2.2.3	Histologia.....	77
2.2.4	Imuno-histoquímica.....	78
2.2.5	Análise Estatística.....	79
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1	PRODUÇÃO DE ACM ANTI-AFB ₁ ATRAVÉS DE CULTIVO DE HIBRIDOMA AF4	79
3.2	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	79
3.3	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	81
3.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	84
4	CONCLUSÃO	87
	CONCLUSÃO GERAL	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE	96
	ANEXO	98

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários, pertencentes à categoria de toxinas naturais de baixa massa molecular, produzidos principalmente por *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. em produtos alimentares, sobretudo em cereais susceptíveis ao crescimento fúngico, seja no campo ou armazenagem de grãos (OKOLI et al., 2007).

As aflatoxinas constituem um grupo de micotoxinas amplamente estudado devido ao efeito comprovadamente tóxico e carcinogênico, produzidas pelo gênero *Aspergillus*, com ênfase a *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Os principais análogos são B₁, B₂, G₁ e G₂ com toxicidade relacionada à hepatotoxicidade e hepatocarcinogênese, sendo a aflatoxina B₁ classificada no Grupo 1 - cancerígeno para o homem - pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2002).

Aflatoxicoses são observadas principalmente em animais, com efeito adverso à saúde aliado ao prejuízo na produção de rebanhos suínos, bovinos, aves e em qualquer outro animal em consequência à ingestão de ingredientes contaminados na dieta. Entre os principais efeitos de aflatoxicose citam-se a redução na taxa de crescimento e reprodução animal, diminuição na produção de leite e ovo, imunossupressão, anemia e carcinoma hepatocelular. Além disso, outras toxinas podem contribuir com efeitos como neurotoxicidade de fumonisinas, além de diarreia, emese e desconforto abdominal de desoxinevalenol (LUCIOLI, 2011 e RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

A Resolução Brasileira n° 07, de 18 de fevereiro de 2011, disponibiliza os limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas em alimentos, contemplando aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas, zearalenona e patulina em milho, arroz, trigo, café, cereais, leite, vinho, entre outros (BRASIL, 2011). Os produtos de origem animal não são contemplados nesta resolução, mas apresentam relação direta com os limites estabelecidos, já que a alimentação básica dos animais são os cereais. A Portaria n° 07, de 09 de novembro de 1988, determina os padrões mínimos de matéria prima destinada à alimentação animal, sendo que entre micotoxinas, somente a aflatoxina é contemplada na portaria, com LMT de 50 µg/kg (BRASIL, 1988).

O desenvolvimento de técnica sensível é essencial na detecção e quantificação de micotoxinas em alimentos e rações, assim como técnicas que permitam visualização direta da toxina e seus efeitos em tecidos animais. Entre as técnicas imunológicas, o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) se popularizou devido ao baixo custo e facilidade de aplicação, com kits comerciais de ELISA disponíveis apresentando

alta especificidade e, com limites de detecção comparáveis aos obtidos por métodos cromatográficos, capaz de detectar nível traço (ng ou pg) com pouca necessidade de limpeza e concentração de analito. A imuno-histoquímica fluorescente é uma técnica analítica sensível e promissora por detectar o composto de interesse diretamente no tecido, além de gerar visualização clara e definida de estruturas nucleares, citoplasma e organelas, possibilitando a diferenciação estrutural por diferentes colorações.

Em consideração ao desenvolvimento de imunoenaios sensíveis na análise de micotoxinas em alimentos e tecidos, como alternativa promissora na quantificação e triagem, pretende-se contribuir com produção de anticorpo monoclonal de alta especificidade, visando validação de imunoenensaio enzimático ic-ELISA e padronização de imuno-histoquímica em material biológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AVICULTURA BRASILEIRA

A agropecuária é um setor de forte influência na economia brasileira, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015) a produção de grãos atingiu 209,5 milhões de toneladas na safra de 2014/2015, com aumento de 8,2% sobre o ano anterior e a previsão para 2016 é de 210,3 milhões de toneladas (CONAB, 2016), movimentando o mercado interno e o setor de exportação. A criação e comercialização de animais também ocupa espaço importante, o Brasil está entre os maiores produtores e exportadores de carne bovina, suína e aves.

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016 a), a produção de carne de frango totalizou 13,1 milhões de toneladas em 2015, volume 3,58% superior ao de 2014, consolidando o Brasil como segundo maior produtor de carne de frango do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. A produção de carne de frango tem destaque na região Sul, sendo os principais fornecedores o Paraná e Rio Grande do Sul, a região Centro – Oeste tem se desenvolvido no setor e ganhado investimentos, por ser grande produtora de grãos.

O consumo per capita de carne de frango atingiu índice médio de 43,25 kg, a mais consumida pelos brasileiros em 2015, devido sobretudo ao aumento no preço da carne bovina, e por ser considerada de sabor mais leve e com baixo teor de gordura, apresenta apelo à saúde e é uma das primeiras escolhas de fonte de proteínas pelos adeptos de dietas

alimentares, além disso, é considerado um alimento de fácil digestão, indicado na alimentação de crianças, idosos e coalescentes (PALLET, 2002 *apud* JULIAO, 2003). Torres et al. (2000) avaliaram a composição centesimal de cortes de aves (Figura 1), nota-se que o peito do frango apresenta o maior teor de proteínas (20,8g/100g) e menor teor de lipídeos (1,84g/100g), comparado às outras partes do frango, justificando sua indicação de consumo por nutricionistas.

Figura 1 – Composição centesimal e valor calórico (kcal/100g) em aves.

ALIMENTOS	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL (g/100g)					kcal
	UMIDADE	CINZA	LIPÍDIOS	PROTEÍNAS*	CARBOIDRATOS	
Coxa de frango s/ osso	70,51	0,78	9,32	18,09	-	156
Fígado de frango	73,81	1,21	4,77	15,05	4,86	123
Peito de frango s/ osso	73,81	1,10	1,84	20,80	-	100
Coxa de Peru (sem pele, sem osso)	75,04	0,93	7,43	16,53	-	133
Peito de Peru (sem pele, sem osso)	75,04	1,12	1,53	21,66	-	100

* Fator de conversão do nitrogênio em proteína -6,25.

Fonte: Torres et al. (2000).

Além do crescimento no mercado interno, a avicultura teve papel determinante no agronegócio brasileiro, as exportações de carne de frango atingiram recorde histórico, superando 4,3 milhões de toneladas em 2015, o mercado internacional segue aquecido com expansão dos negócios principalmente no Oriente Médio e Ásia. O Brasil manteve não apenas a liderança mundial, como foi responsável por 37% das exportações mundiais, atingindo em receita R\$ 23,9 bilhões, com elevação de 26% em relação a 2014 (ABPA, 2016 b).

A alta produtividade e conquista do mercado externo dependem de fatores que garantam a qualidade, sanidade e preço do produto final. A avicultura brasileira buscou modernização através do manejo adequados dos aviários, sanidade animal, alimentação balanceada, melhoramento genético e parceria entre indústria e avicultores, que contribuiu na redução dos custos e aumento da qualidade em todas as etapas da cadeia produtiva. Embora haja avanço na avicultura brasileira, persistem ainda fatores que levam à queda na produtividade e qualidade do produto final e precisam ser avaliados para obter melhores estratégias de controle no manejo.

Operações pré-abate de frangos de corte é identificado como ponto de perdas, pode-se citar o período de jejum a que as aves são submetidas 8 a 12 horas antes do abate, a fim de minimizar a contaminação no abatedouro devido ao esvaziamento do sistema digestório, quanto maior o tempo de jejum maior é a diminuição no peso das aves, além disso, em períodos prolongados de jejum as aves sofrem estresse, desestabilizando sua flora intestinal que permite a entrada de bactérias oportunistas, como *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e *Staphylococcus aureus*, esses microrganismos reduzem o tempo de prateleira e podem causar toxinfecções alimentares (RUI; ANGRIMANI; SILVA, 2011). A captura para transporte ao abatedouro é um dos momentos que geram maior estresse e injúrias físicas às aves, levando a prejuízos como contusões e perda de peso (CASTILLO & RUIZ, 2010 *apud* RUI; ANGRIMANI; SILVA, 2011).

Na etapa de carregamento, deve ser considerada a densidade das aves por caixa, as condições climáticas e o tamanho da caixa, a fim de que as aves tenham espaço suficiente para deitar sem que ocorra amontoamento, sabe-se que à medida que aumenta o número de aves por caixa há aumento na mortalidade, entretanto devido à redução no valor do frete esse hábito ainda é praticado. Durante o transporte, alguns estímulos podem estressar os frangos, comprometendo o bem-estar e a qualidade da carne, entre eles estão o estresse térmico pela alta temperatura e umidade a que as aves ficam expostas, estresse pelo frio devido a alta velocidade do transporte e estresse social pela alta lotação nas caixas, vibração, aceleração e barulho do caminhão (JORGE, 2008 *apud* RUI; ANGRIMANI; SILVA, 2011).

O estresse compromete o bem-estar do animal e afetam o seu sistema imunológico, aumentando a susceptibilidade a doenças e levando a perdas na produção. Condições anteriores ao pré-abate igualmente devem ser alvo de atenção, sobretudo as doenças infecciosas e as condições de origem tóxicas, como as micotoxinas, que são fatores importantes na redução da capacidade imunológica das aves e podem levar a perdas de praticamente toda a granja se não detectadas e tratadas em tempo hábil.

As principais doenças infecciosas estão ligadas a agentes virais, a doença da bursa de Fabrícus ou doença de Gumboro é causada pelo vírus da família *Birnaviridae*, que se replica nos linfócitos B, destruindo as células responsáveis pela produção de anticorpos, assim as aves ficam mais vulneráveis a infecções e não respondem de maneira eficiente às vacinas. A doença de Marek é causada por Herpesvírus que também gera imunossupressão, provoca infecção nos linfócitos tendo como consequência a redução da quantidade de linfócitos T e B circulantes e reduz também os títulos de anticorpos contra as vacinas aplicadas nas aves (JAENISCH; CARON; SCHIMIDT, 2014).

Os agentes imunossupressores tóxicos estão principalmente associados às micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos que se desenvolvem nos grãos tanto na etapa de produção a campo quanto no armazenamento, e chegam aos animais via alimentação pela ração contaminada. As micotoxicoses geram quadros clínicos agudos ou crônicos, a severidade depende de fatores como o tipo de micotoxina, duração da exposição e a dose, entre os efeitos observados estão redução na taxa de crescimento e reprodução dos animais, diminuição na produção de ovos e efeitos tóxicos particulares de cada toxina. As aflatoxinas são destaque na avicultura, reconhecidas pelo efeito hepatotóxico e imunossupressor, levam à ineficiência das vacinas utilizadas, gerando perdas por doenças mesmo para as quais as aves tenham sido vacinadas (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010 e JAENISCH; CARON; SCHIMIDT, 2014).

2.2 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Penicilium* spp. e *Fusarium* spp., não possuem significância bioquímica no crescimento e desenvolvimento fúngico, mas podem causar efeitos prejudiciais a humanos e animais pela ingestão, inalação e contato com a pele. As doenças causadas por essas substâncias são denominadas micotoxicoses, se caracterizam como não transmissíveis, não contagiosas ou infecciosas, e o tratamento com drogas e antibióticos possuem pouco ou nenhum efeito sobre a doença (HUSSEIN; BRASEL, 2001; OKOLI et al., 2007; MARIN et al., 2013).

As micotoxinas estão presentes na cadeia alimentar devido à infecção fungica das colheitas, sobretudo de cereais, a Food Agriculture and Organization of the United Nations (FAO) estima que aproximadamente 25% dos cereais produzidos no mundo estão contaminados com micotoxinas (RICE & ROSS, 1994 *apud* MARIN et al., 2013). O crescimento fúngico é influenciado por diversos fatores, como temperatura (ótima 25-30°C), umidade (> 11,0%), aeração do substrato, atividade de água e o estado fisiológico do fungo (GARCIA et al., 2012 e TESSARI; CARDOSO, 2012). O fungo pode se desenvolver em diversas etapas da cadeia produtiva, na pré-colheita durante o crescimento da planta, na colheita e secagem e no armazenamento dos grãos. Quando há produção de micotoxinas, elas persistem durante o armazenamento e são resistentes ao processamento, sobretudo por serem quimicamente estáveis e termorresistentes. Constituem em perigo natural na cadeia produtiva do alimento, e condições de prática agrícola inadequada, secagem ineficiente, manipulação

dos alimentos, armazenamento, embalagem e transporte inadequado podem promover o crescimento fungico e a produção de micotoxinas (DORNER, 2008; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; SOUZA et al., 2013 e MARIN et al., 2013).

Micotoxinas são normalmente lipofílicas e tendem a se acumular nas frações de gorgura de plantas e animais (HUSSEIN; BRASEL, 2001). São ingeridas através do consumo direto de cereais ou derivados contaminados, ou através do consumo de carnes e produtos de origem animal, como leite e ovos, onde as micotoxinas tem origem na alimentação animal, constituída basicamente de cereais (MARIN et al., 2013). Os efeitos tóxicos podem se acumular em órgãos e tecidos de humanos e animais, o nível de toxicidade depende da espécie, mecanismos de ação de cada toxina, metabolismo e mecanismo de defesa do indivíduo (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

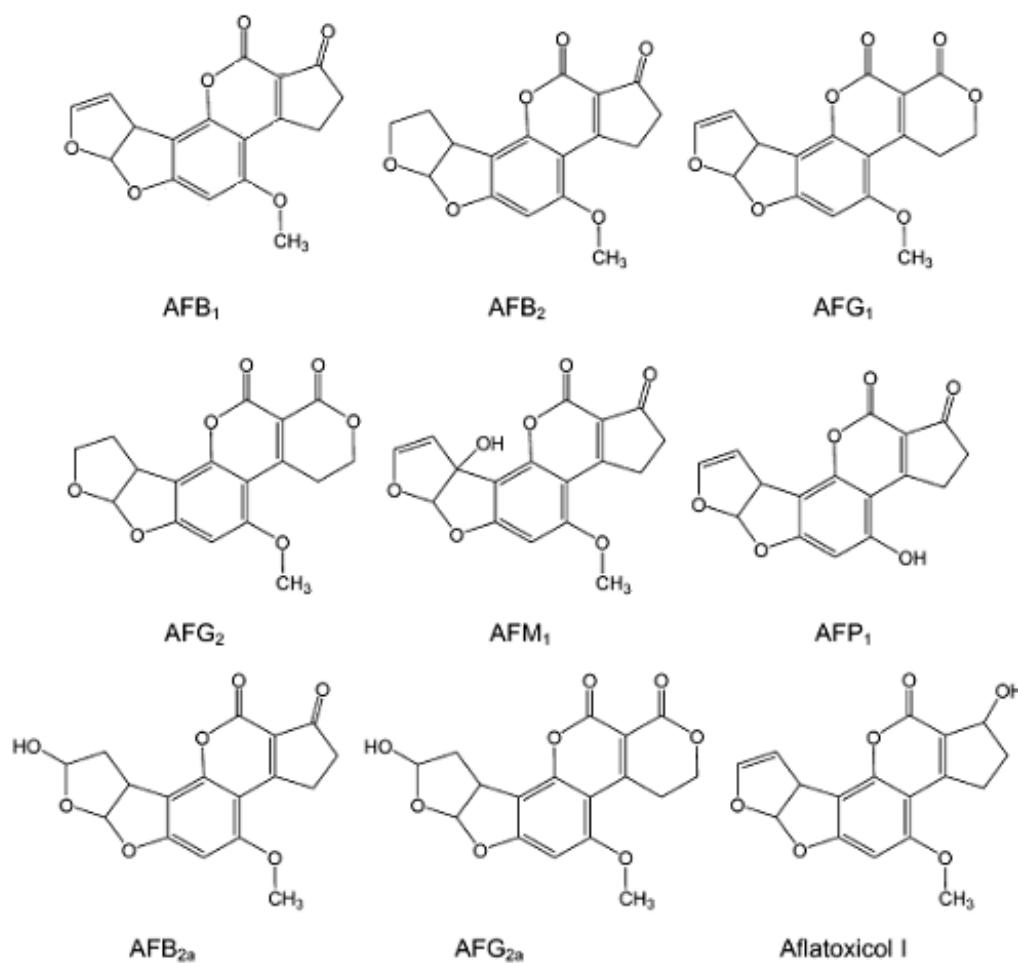
2.2.1 Aflatoxina

Aflatoxinas (AF) são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, sobretudo *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*, o nome “aflatoxina” é derivado da primeira letra em *Aspergillus* e das três primeiras letras em *flavus* (SCHOENTAL, 1967 *apud* RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010). A produção fúngica das AFs e sua potente atividade biológica em baixas concentrações estimularam pesquisas em todo mundo, sendo um dos grupos mais estudados dentre as micotoxinas. AFs foram inicialmente isoladas e identificadas devido a “Turkey X Disease”, em 1960, que causou morte generalizada de 100 mil perus e outras aves na Inglaterra devido à presença de aflatoxinas na alimentação dos animais, posteriormente, identificou-se que a contaminação teve origem na farinha de amendoim proveniente do Brasil, que continha a micotoxina e foi usada no preparo da ração (HUSSEIN; BRASEL, 2001 e RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

Estruturalmente, aflatoxinas são definidas como derivados de difuranocumarinas que fluorescem sob luz ultravioleta, dependendo da cor que fluorescem são divididas em aflatoxinas B₁ e B₂ (fluorescência em azul), e G₁ e G₂ (fluorescência em verde). Aflatoxinas M₁ e M₂ são conhecidas como AFs do leite e são metabólitos das AFB₁ e AFB₂ respectivamente, outros metabólitos conhecidos da AFB₁ são aflatoxicol e aflatoxina Q₁ (LEE et al., 2004 e RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010). A série G de aflatoxinas difere quimicamente da B pela presença do anel 3-lactona, ao invés do anel de ciclopentano presente nas AFB (Figura 2); com relação as AFB₁ e AFG₁, ambas possuem uma dupla ligação na forma de vinil éter no terminal do anel furano, o que não ocorre nas formas AFB₂ e AFG₂,

essa pequena diferença na estrutura está ligada a uma significativa mudança na atividade biológica, sendo as AFB₁ e AFG₁ consideradas mais tóxicas que a AFB₂ e AFG₂, respectivamente (JAIMEZ et al., 2000). Estudos mostram que AFB₁ é a mais tóxica tanto nas aflatoxicoses crônicas quanto agudas, os níveis de toxicidade para AFG₁, AFB₂ e AFG₂ foram equivalentes a 50, 20 e 10% da AFB₁, respectivamente (COLE & COX, 1981 e TERAOKA & UENO, 1978 *apud* HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Figura 2 – Estrutura das aflatoxinas e seus metabólitos.



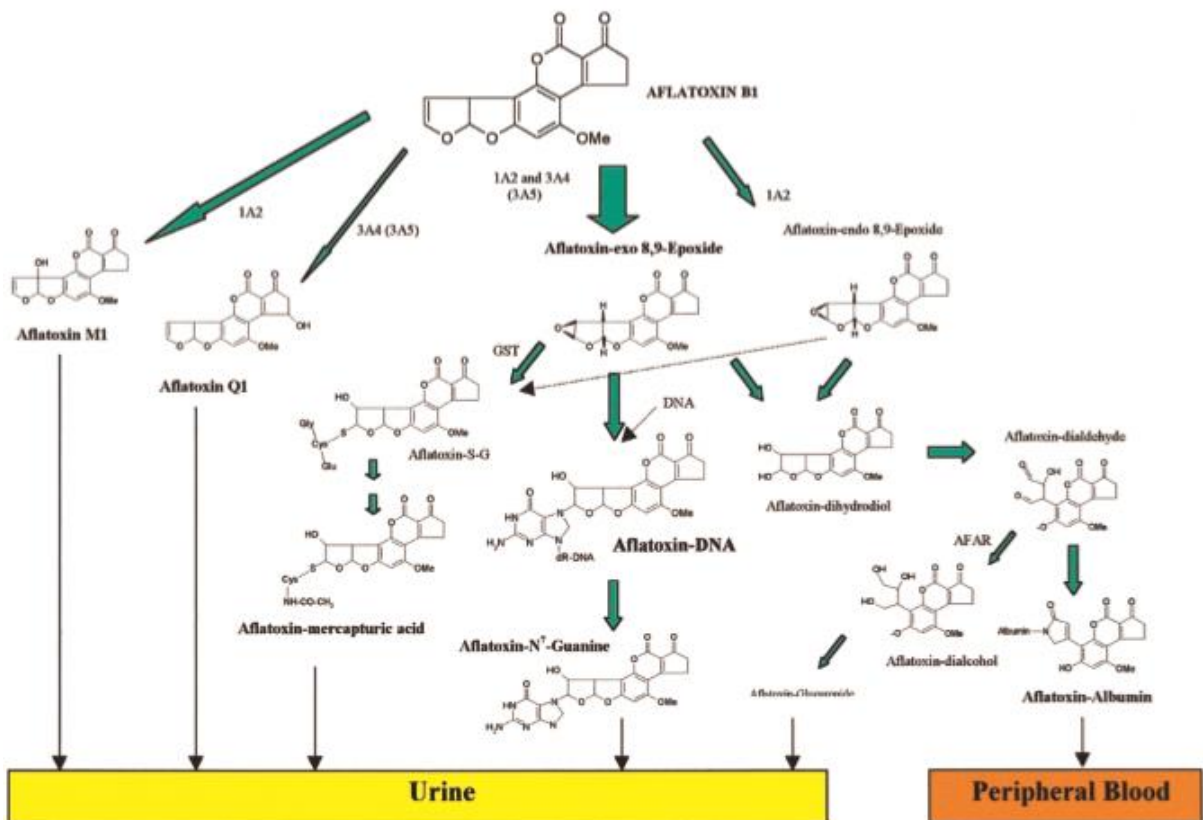
Fonte: LEE et al. (2004).

Exposições agudas às AFs foram associadas à epidemia de hepatites na China e na África, outros efeitos agudos observados são erupção cutânea, náusea e vômito, dor de cabeça, dor abdominal, edema pulmonar, coma e convulsão (HUSSEIN; BRASEL, 2001 e RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010). Os efeitos mais consideráveis das AFs estão relacionados à exposição crônica, já que micotoxinas são produzidas em baixa quantidade pelos fungos, e sua ingestão via alimentação raramente leva a sintomas imediatos. Pelos

efeitos crônicos, AFs são consideradas mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas para humanos e animais, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) as classifica no grupo I como carcinógeno para o humano, primariamente atingindo o fígado (HUSSEIN; BRASEL, 2001; IARC, 2002; LEE et al., 2004 e CALLERI et al., 2007).

Segundo LEE et al. (2004), AFB₁ induz mutação no códon 249 do gene supressor de tumor p53, que perde sua função, conforme foi evidenciado em hepatocarcinomas. O efeito mutagênico da AFB₁ em humano e animal pode ser explicado pela sua biotransformação, mediada pelo citocromo p-450 micromossosomal intra e extra-hepático (Figura 3). AFB₁ é ativada pelo citocromo em AFB₁-8,9-*exo*-epóxido e AFB₁-8,9-*endo*-epóxido, o AFB₁-8,9-*exo*-epóxido que se liga ao DNA, na posição N7 da base purínica guanina, para formar predominantemente 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB₁, responsável pelas propriedades mutagênicas da AF (WILD; TURNER, 2002 e MARIN et al., 2013). Além disso, AFB₁-8,9-*exo*-epóxido pode se ligar a proteínas e outros nucleófilos que são críticos para o metabolismo celular (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

Figura 3 – Metabolismo principal da Aflatoxina B₁.



Fonte: WILD e TURNER (2002).

Outros metabólitos são formados a partir da AFB₁, entre eles a AFQ₁, AFM₁ e AFP₁, esses e as demais aflatoxinas (B₂, G₁ e G₂) são considerados substratos pobres para a epoxidação, e portanto, são menos mutagênicos, carcinogênicos e tóxicos que a AFB₁. A via principal de detoxificação dos *exo* e *endo*-epoxi da AFB₁ ocorre pela conjugação com redução da glutathiona (GSH) para formar AFB₁ *exo* e *endo*-epoxi conjugados, reação catalisada pelas glutathiona-S-transferases (GSTs), família de proteínas multifuncionais que participam da detoxificação celular e excreção de substâncias xenobióticas (WILD; TURNER, 2002 e RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

O controle das aflatoxinas deve ser feito no armazenamento dos grãos, etapa em que são principalmente produzidas (SCHENZEL et al., 2012). A contaminação por AFs afeta economicamente a agricultura e a produção animal, gerando custo elevado que prejudica todos os setores, desde a produção até o consumidor (LEE et al., 2004). Estima-se perda anual de 932 milhões de dólares na colheita por contaminação com micotoxinas, e 466 milhões de dólares em esforços para prevenir e reduzir contaminações (CAST, 2003).

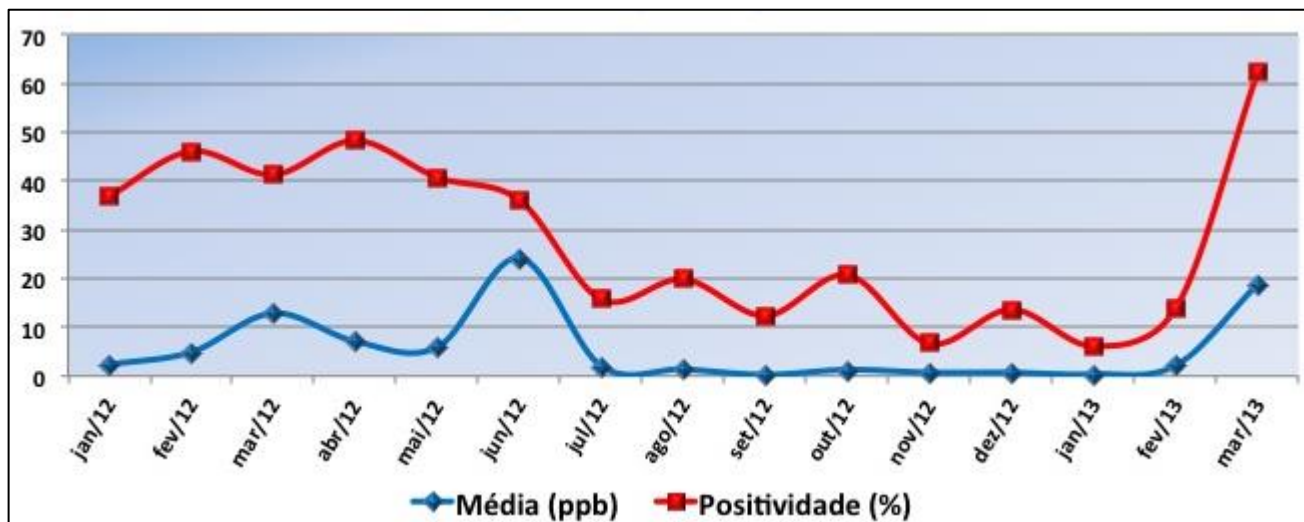
A produção animal é atingida pelas micotoxinas devido à baixa qualidade dos grãos destinados às rações. A Legislação Brasileira é falha no controle de micotoxinas na alimentação animal, recentemente entrou em vigor a Resolução Brasileira n° 07, de 18 de fevereiro de 2011, que contempla somente produtos destinados à alimentação humana (BRASIL, 2011), no caso animal permanece em vigência a Portaria n° 07, de 09 de novembro de 1988, que determina os padrões mínimos de matéria prima destinada à alimentação animal, dentre as micotoxinas, somente a aflatoxina é contemplada, com limite máximo de 50 µg/kg (BRASIL, 1988). Na Comunidade Européia, a EC No 32/2002 estabelece os limites máximos de substâncias indesejadas na alimentação animal, contemplando dentre as micotoxinas, a aflatoxina B₁, com limite máximo de 20 µg/kg, posteriormente entrou em vigor a EC 576/2006, que estabelece o limite máximo de outras cinco micotoxinas na ração animal, sendo elas desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, tricoteceno e fumonisina.

2.2.1.1 Aflatoxina em aves

No caso das aves, a alimentação é principalmente a base de milho. A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) recomenda que a ração contenha 60% do seu total constituído desse cereal. Souza et al. (2013) avaliaram a coocorrência de micotoxinas em milho e ração animal no Brasil, com total de 119 amostras coletadas no estado do Paraná entre 2005 e 2006, fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras

analisadas, variando de 32 a 6.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no milho e de 50 a 1.118 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na ração, como já esperado, a contaminação de fumonisina no milho é frequente e acompanhada de maiores concentrações, segundo os autores. Somente quatro amostras foram positivas para AF com baixas concentrações, o maior valor encontrado para AFB_1 em milho foi de 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, as demais amostras estavam abaixo dos limites de detecção de 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFB_1 , G_1 , B_2 e G_2 respectivamente. Domenico et al. (2016) avaliaram a presença de *Aspergillus* sp. e aflatoxinas em amostras de milho cultivado nas safras de inverno 2012 e verão 2012/2013 no Paraná, *Aspergillus* sp. foi detectado em 20,4% e 83,3% das amostras da safra de inverno e verão respectivamente, os níveis de aflatoxina foram 2,8 a 14,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na safra de inverno e de 3,0 a 197,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na safra de verão. O Laboratório de Análises Micotoxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria, publicou em 27/03/2013 online a média das concentrações de aflatoxinas em milho de jan/2012 a mar/2013, conforme observado na Figura 4.

Figura 4 - Resultado da média de aflatoxina em milho, no período de jan/2012 a mar/2013.



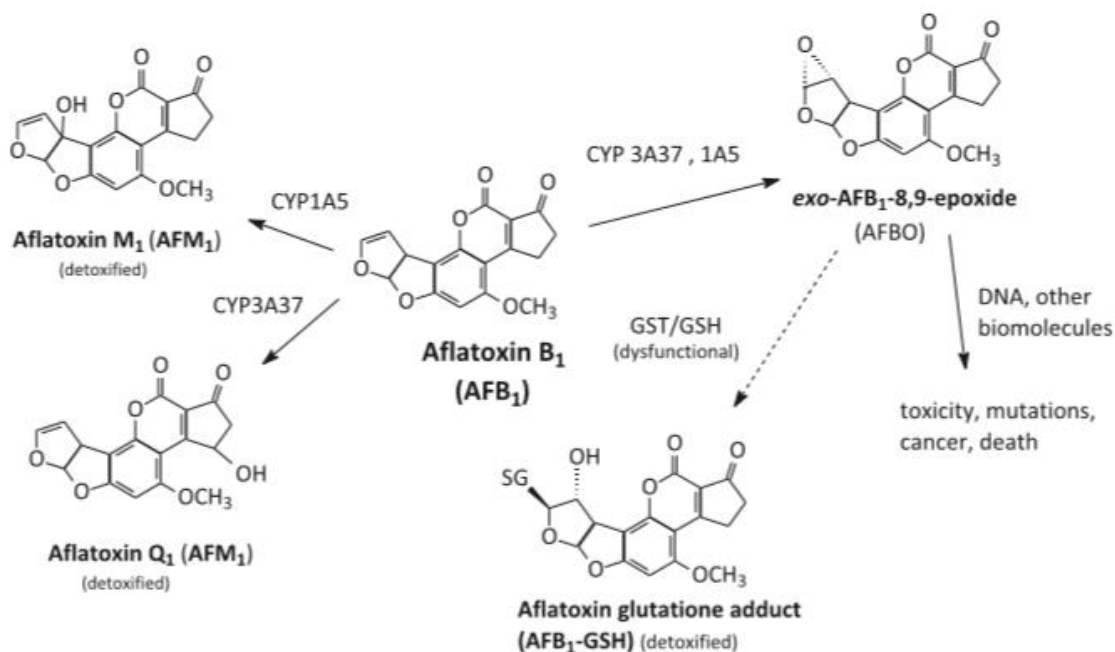
Fonte: LAMIC, UFSM. Disponível em: http://www.lamic.ufsm.br/web/?q=resultados_milhoafatoxinas, acesso em 06/08/2014.

Efeitos tóxicos de AFs em aves ocorrem em concentrações abaixo de 15-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, entre as espécies são observadas toxicidades diferentes, os perus são mais sensíveis, suas enzimas hepáticas ativam a AFB_1 em epóxido cerca de 3 a 4 vezes mais que as enzimas de frangos, que são relativamente mais resistentes (LOZANO & DIAS, 2006 *apud* RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010). AFs são absorvidas no trato gastrointestinal das aves, através da difusão passiva pelo intestino, e são biotransformadas primariamente no

fígado (WYATT, 1991 *apud* TESSARI; CARDOSO, 2012), a absorção é muito rápida, de modo que após 3 horas da sua ingestão, a AF já pode ser evidenciada em diferentes tecidos, principalmente no fígado, moela, órgãos reprodutores e rins, possivelmente devido à afinidade e/ou função que esses órgãos desempenham na eliminação das toxinas (RAMOS & HERNADES, 1996 e SAWHNEY, 1973 *apud* TESSARI; CARDOSO, 2012).

A metabolização da aflatoxina pela citocromo p-450 em ave é similar a que ocorre em humano, resultando nos mesmos metabólitos e AFB₁-8,9-*exo*-epóxido a partir da AFB₁ (Figura 5), a diferença ocorre na falta de eficiência no sistema de detoxificação mediado pelas GSTs em aves, com baixa afinidade do epóxido-AFB₁ pelas GSTs, sendo essa a provável razão de aves serem extremamente sensíveis à AFB₁ (KLEIN, 2000 *apud* RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

Figura 5 – Metabolização da AFB₁ em aves.



Fonte: RAWAL et al. (2010).

A toxicidade das AFs em frango é mais relevante na fase inicial de criação até os 21 dias de vida, porém o efeito negativo no ganho de peso persiste até a fase final de criação (HUFF, 1986 *apud* TESSARI; CARDOSO, 2012). Na intoxicação aguda os principais efeitos observados são perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragia e morte. A primeira mudança é aumento no tamanho dos órgãos internos como fígado, baço e rins, enquanto a “bursa de Fabricius” e o timo diminuem (OSWEILER, 1990 *apud* TESSARI;

CARDOSO, 2012). Na síndrome crônica, o sinal mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais (LEESON, 1995 *apud* TESSARI; CARDOSO, 2012).

Tessari (2004 *apud* TESSARI; CARDOSO, 2012) demonstrou que a ingestão de AF em níveis a partir de 50 µg/kg na ração resultou em diminuição da resposta imunológica humoral de frangos de corte vacinados contra doença de Newcastle, a ingestão desta concentração de toxina provocou também quadro de anemia, acompanhado de leucopenia e trombocitose, e redução no peso corpóreo dos frangos ao final do experimento. Esses dados mostram que o limite máximo de aflatoxinas em rações (50 µg/kg) adotado pela Legislação Brasileira (BRASIL, 1988) não é seguro na criação de frangos de corte, já que este nível acarretou em alterações significativas nas aves, afetando seu desempenho.

Williams, Deschl e Williams (2011) avaliaram dano ao DNA em células de fígado de embriões de perus e frangos pela inoculação de 0,062 µg AFB₁/ovo e 6,2 µg AFB₁/ovo, em tempos de exposição de quatro horas (curto prazo) e quatro dias (longo prazo). A taxa de sobrevivência dos embriões de perus e frangos diminuiu após exposição à micotoxina, atingindo nos grupos que receberam maior concentração de AFB₁ valores de 80% de sobrevivência após quatro horas de exposição, e 50% de sobrevivência após quatro dias. A DL₅₀ (dose que provoca a morte em 50% dos indivíduos de uma população teste) foi estabelecida em 6,2 µg/ovo para ambas as aves, o peso médio inicial dos ovos foi de 64 g para frango e 85 g para peru, ao final do experimento, foram reportados 19 g para frango e 38 g para peru.

O dano ao DNA foi avaliado pelo teste cometa, sendo o controle positivo o composto N-Methyl-N⁷-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), substância carcinógena reativa com DNA, no teste foi verificado que mesmo a baixa dose de AFB₁ (0,062 µg/ovo) produziu dano ao DNA das células de ambas as espécies. Na administração da maior concentração de AFB₁ (6,2 µg/ovo), após quatro horas de exposição os grupos apresentaram teste positivo do cometa, com aumento no comprimento da cauda de 35% para perus e 37% para frangos, esse aumento é indicativo de lesões no DNA. Após quatro dias de exposição a 6,2 µg de AFB₁/ovo, o aumento da cauda no teste de cometa foi de 32% para perus e 35% para frangos, segundo análise estatística, o comprimento da cauda após quatro horas foi maior do que após quatro dias para perus, e para frangos não houve diferença significativa.

A presença de aflatoxina no fígado das aves constitui um indicador eficaz de contaminação via alimentação, Stamford et al. (2005) analisaram 216 amostras de fígado de frango, provenientes das regiões nordeste, sul e sudeste do Brasil, quanto a presença de aflatoxina total e ocratoxina A por kit comercial de ELISA, aflatoxina total foi detectada em

88,9% das amostras, com níveis entre 1,7 µg/kg e 5,8 µg/kg, já a ocratoxina A foi detectada em 42,9% das amostras com níveis variando de 5,1 mg/kg a 5,6 mg/kg.

Salle et al. (2001) quantificaram os níveis de aflatoxina em fígados de frangos de corte de uma integração avícola do Rio Grande do Sul, do qual participaram 24 criadores, com o total de 394 amostras divididas em quatro grupos, segundo as estações do ano em que foram coletadas. A frequência de contaminação variou de 31,6 a 83,3% na primavera e outono, respectivamente, as médias de aflatoxina variaram de 0,54 µg/kg na primavera a 2,41 µg/kg no outono, embora não tenha havido diferença significativa entre as estações do ano, os resultados demonstram uma tendência de que a sazonalidade pode influenciar nos níveis de contaminação das rações, e conseqüentemente dos animais.

Outro problema associado à ingestão de AFs pelas aves é a transferência de seus metabólitos, em especial AFB₁ e aflatoxicol, para os ovos, já que este é um alimento de consumo humano por ser fonte de nutrientes, e a presença da toxina constitui uma ameaça potencial à saúde do consumidor (TRUCKSESS, 1983 *apud* OLIVEIRA et al., 2000). Aly e Anwer (2009) avaliaram a performance de quarenta galinhas poedeiras alimentadas com rações naturalmente contaminadas com aflatoxinas, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/kg de ração por 60 dias, verificaram também a evidência de resíduos de AFB₁ nos ovos e a estabilidade da toxina após submeter os ovos contaminados ao processo de ebulição por 20 minutos.

O estudo mostrou que a produção e o peso médio dos ovos não foram afetados pela aflatoxina, em contrapartida, houve uma diminuição significativa no consumo da ração nos grupos alimentados com 50 e 100 µg/kg de ração (Tabela 1). Os resíduos de AFB₁ nos ovos foram detectados com médias de 0,04; 0,05 e 0,07 µg/kg, nos grupos de 25, 50 e 100 µg/kg de ração, respectivamente, com taxas de transmissão de 625:1; 500:1 e 1428: 1 (Tabela 2), essa variação confirma que somente pequenas quantidades de AFB₁ são transferidas, enquanto que a maior quantidade da toxina é depositada nos tecidos das aves. A toxina foi estável ao processo de ebulição submetido aos ovos. Os autores concluíram que a possibilidade de transmissão de AFB₁ para os ovos é maior em condições onde as aves são expostas a concentrações relativamente baixas da toxina e após longo tempo de exposição, este fato pode estar relacionado à capacidade reduzida das aves em detoxificar a toxina.

Aflatoxinas resultam em perdas econômicas na indústria aviária pela redução na taxa de crescimento, na produção de ovos, na eficiência da alimentação e na imunidade, levando ao desenvolvimento de doenças que podem ser fatais (COULOMBE, 1993 *apud* RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010). Medidas de controle e o desenvolvimento

de técnicas sensíveis e rápidas, que permitam a detecção de micotoxinas em material biológico, são importantes para traçar medidas preventivas e/ou corretivas antes que a produção aviária seja comprometida.

Tabela 1 – Efeitos de dietas contaminadas com aflatoxina em galinhas poedeiras.

Aflatoxinas em ração (µg/kg)	Produção de ovo (%)	Peso de ovo (g)	Ingestão de ração (g/ave/dia)
Zero (controle)	74,66±1,8	59±3,2	104±11,5 ^b
25	74,9±8,8	59±4,2	102±10,4 ^b
50	74,0±6,6	58±3,1	85±8,6 ^a
100	74,7±9,4	58±3,7	83±9,9 ^a

Fonte: Aly e Anwer (2009).

Tabela 2 – Média de AFB₁ em ovos durante 60 dias de exposição de galinhas poedeiras a diferentes níveis de aflatoxina na ração (µg/kg).

Aflatoxina na ração	1-7° dia	10° dia	20° dia	30° dia	40° dia	50° dia	60° dia	Média ± DV	Ração para ovos Razão de AFB ₁
0(controle)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
25	ND	0,03	ND	0,04	ND	0,04	0,05	0,04±0,01	625:1
50	ND	0,05	0,06	0,03	0,03	0,05	0,07	0,05±0,01	500:1
100	ND	0,08	0,07	0,06	0,07	0,07	0,09	0,07±0,01	1428:1

ND: não detectado (limite de detecção do método analítico: 0,01 µg/kg de aflatoxina B₁)

Fonte: Aly e Anwer (2009).

2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICOTOXINAS

2.3.1 Métodos Cromatográficos

A detecção eficiente de micotoxinas é essencial no controle de qualidade e monitoramento, já que os alimentos devem possuir segurança e ser ausentes de perigos para a população, além da necessidade de cumprimento de acordos comerciais (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002). A presença do fungo produtor não necessariamente indica a presença da micotoxina, visto que outros fatores ambientais envolvem a sua formação, igualmente, a ausência de colônias fúngicas no substrato não é garantia de que haverá

ausência de micotoxinas no mesmo, já que o fungo pode ter morrido e deixado a toxina intacta no alimento (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

O fato das micotoxinas serem tóxicas em baixas concentrações requer métodos sensíveis e confiáveis para sua detecção. Os cuidados devem começar na amostragem, aproximadamente 90% dos erros de análise são atribuídos a maneira como a amostra original foi coletada, visto que os fungos geralmente tendem a se desenvolver isoladamente e não uniformemente distribuídos nos produtos armazenados, gerando resultados falso-positivos ou falso-negativos na análise. Assim, é importante o desenvolvimento de protocolos que garantam que a amostra retirada para análise seja representativa do lote (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Devido às variações de estrutura das micotoxinas, não é possível utilizar uma única técnica padrão para analisar todos os compostos, o que é satisfatório para algumas moléculas pode ser inadequado para outras com propriedades similares ou para a mesma molécula em matrizes diferentes. Diferentes métodos de análise são desenvolvidos em todo o mundo, a busca por técnicas simples, baratas e efetivas tem sido requerida para as micotoxinas devido a sua notável importância, baseada na toxicidade desses compostos e seus limites em alimentos impostos pelas legislações (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

O método mais popular usado na detecção é a cromatografia em camada delgada (CCD), que permite a triagem de micotoxinas em grande quantidade de amostras de forma simples e barata. Usada para fins quantitativos e semiquantitativos, essa técnica tem baixo custo de operação e facilidade na detecção dos compostos de interesse pela análise na faixa do UV-visível, com comparação simultânea das amostras com substâncias padrão. Apresenta como desvantagens a necessidade de pré-tratamento das amostras, o uso de quantidades elevadas de solvente, sendo que muitos protocolos validados para detecção de aflatoxinas utilizam solventes clorados, como diclorometano e clorofórmio na fase móvel, e desde que esses compostos foram considerados nocivos ao meio-ambiente, sua utilização deve ser evitada nos laboratórios, e por fim a falta de automação da técnica, onde a precisão dos resultados depende da experiência do técnico (STROKA; OTTERDIJK; ANKLAM, 2000 e TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a metodologia padrão para análise de micotoxinas nas indústrias, diferentes adsorventes podem ser usados de acordo com as características físicas e químicas das moléculas, as colunas em fase normal ou fase reversa são usadas na separação e purificação das toxinas dependendo da sua polaridade. Os

métodos de detecção mais comuns são detectores por UV ou fluorescência, algumas micotoxinas como ocratoxina, aflatoxina e citrinina possuem cromóforos fluorescentes naturais nas suas moléculas e podem ser detectados diretamente, outras como a fumonisina, não possuem cromóforos naturais e sua determinação por fluorescência requer derivatização da molécula (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

A análise de aflatoxina por CLAE é precedida de uma sequência de operações que incluem preparo das amostras, extração, limpeza e concentração do extrato obtido, essas etapas são de fundamental importância para garantir a correta separação, quantificação e confirmação da presença da micotoxina realizada pelo equipamento. Não existe um único método adequado para extração, devido à diversidade de matrizes que podem conter as AFs, a técnica deve levar em consideração as propriedades físicoquímicas de cada matriz, as AFs são ligeiramente solúveis em solvente polares e insolúveis em solventes totalmente apolares, sendo normalmente extraídas com metanol, acetona e clorofórmio. A etapa de extração e limpeza pode ser realizada por partição líquido - líquido, colunas de extração em fase sólida, constituídas por sílica, C₁₈, C₈, entre outros, e colunas de imunoafinidade, constituídas por anticorpos antiaflatoxinas, que retêm as moléculas de AFs por afinidade (JAIMEZ et al., 2000).

A quantificação de micotoxinas por CLAE é um método robusto e sensível, a possibilidade do acoplamento com espectrômetro de massa permitiu análise de compostos em menor limite de detecção, reduziu a necessidade de derivatização, gera informações estruturais dos analitos e possibilita análise de grande variedade de compostos, porém exige etapas de pré-preparo, como as citadas anteriormente, equipamento de alto custo, uso de reagentes de alta pureza e técnicos treinados para operação do equipamento, sendo a grande desvantagem o custo da análise (BERTHILLER et al., 2007 e ONO et al., 2007).

2.3.2 Métodos Imunológicos

Métodos baseados em sistemas biológicos tem ganhado espaço na detecção de micotoxinas por apresentarem menor custo, sensibilidade, especificidade e rapidez. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais e policlonais com alta especificidade e sensibilidade à micotoxinas permitiu o desenvolvimento de métodos imunológicos bastante úteis na limpeza das amostras, como as colunas de imunoafinidade, que impulsionaram a obtenção de extratos com baixos interferentes de matriz; e o ensaio ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), aplicado na triagem de amostras quanto à presença de micotoxinas,

facilitando e reduzindo a utilização de sistemas cromatográficos (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002).

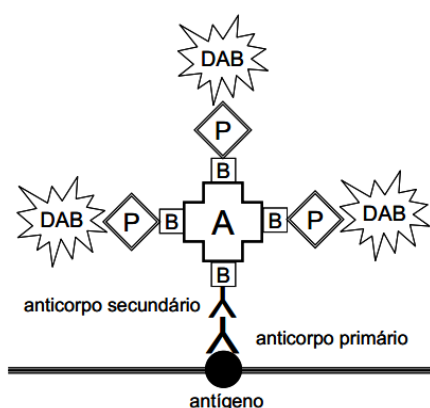
O ensaio imunoenzimático ELISA se tornou popular devido ao baixo custo e facilidade de aplicação, *kits* comerciais de ELISA disponíveis para detecção de micotoxinas são baseados em um sistema competitivo direto ou indireto. No sistema competitivo direto o anticorpo é imobilizado na placa e se liga especificamente a sítios do antígeno caso eles estejam presentes na amostra, são adicionados marcadores colorimétricos, no caso anticorpos marcados com enzimas responsáveis pelas reações com emissão de cor, esses anticorpos irão se ligar a outro sítio específico do antígeno imobilizado, nesse caso a intensidade da coloração gerada é diretamente proporcional à concentração dos antígenos na amostra. O ELISA competitivo indireto é o mais indicado na detecção de micotoxinas, devido a baixa imunogenicidade desses compostos, nesse caso a toxina é imobilizada na placa ao invés do anticorpo, o princípio baseia-se na competição entre a toxina presente na amostra e a toxina imobilizada, pelo sítio de ligação específico do anticorpo monoclonal, assim quanto maior a concentração de toxina na amostra, menor vai ser a ligação do anticorpo com a toxina imobilizada na placa, e a reação de coloração será indiretamente proporcional à concentração de toxina presente (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004 e LI; ZHANG; ZHANG, 2009).

Ensaio ELISA pode ser portátil, é rápido e apresenta alta especificidade, com limites de detecção comparáveis aos obtidos por métodos cromatográficos, capaz de detectar traços de um composto (ng ou pg) com pouca ou nenhuma necessidade de limpeza e concentração do analito, dentre as desvantagens estão possíveis resultados falso positivos, pela possibilidade de reações cruzadas dos anticorpos com outros componentes que não micotoxinas, e falsos negativos, sendo a validação desse ensaio essencial para confiabilidade dos resultados, além disso, há possibilidade do uso do *kit* uma única vez, após cada análise o *kit* deve ser descartado, aumentando o custo em casos de triagem das amostras (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002, FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004 e TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Todo imunoensaio depende de um marcador molecular capaz de gerar sinais de detecção, que podem ser isótopos radioativos, enzimas, compostos fluorescentes ou eletrônicos (LI; ZHANG; ZHANG, 2009). A utilização de enzimas tem sido difundida, sobretudo devido a ensaios imunoenzimáticos, como exemplo de vasta aplicação destaca-se o sistema de enzimas peroxidase, com emissão de cor por cromógenos a base de benzidina ou pelos sistemas avidina-biotina conjugados à peroxidase que amplificam o sinal (Figura 6), esta técnica fundamenta-se na afinidade da glicoproteína avidina pela biotina (vitamina que

pode ser conjugada a anticorpos e enzimas), onde o anticorpo primário se ligará ao composto de interesse e é colocado um antianticorpo secundário ligado a uma molécula de biotina, adiciona-se então um complexo macromolecular formado por avidina e biotina complexada com peroxidase (complexo ABC), a avidina possui quatro sítios de ligação com a biotina, mas somente três moléculas de biotina estão ligadas, a quarta ligação ocorre com a biotina do anticorpo secundário, gerando um efeito amplificador do sinal na ação da peroxidase com o substrato cromogênico diaminobenzina (ARAUJO, 2006).

Figura 6 – Representação esquemática do sistema avidina-biotina-peroxidase.



DAB: diaminobenzidina; P: peroxidase; B: biotina; A: avidina.

Fonte: REIS, 1998 *apud* ARAUJO, 2006.

Os marcadores fluorescentes constituem outra opção de marcação, se desenvolveram rapidamente nos últimos 15 anos e apresentam as vantagens de alta sensibilidade observadas em enzimas e compostos radioativos, mas sem os perigos radioativos associados. Os compostos fluorescentes tem a capacidade de emitir energia luminosa em determinados comprimentos de onda, podem ser compostos orgânicos, inorgânicos, ou tipos especiais de proteínas, devem possuir estrutura química estável, alta intensidade de sinal fluorescente e conter um grupo químico ativo (carboxil, amino, entre outros) que permite conjugação com anticorpos ou haptenos. Micropartículas fluorescentes são consideradas novos biomarcadores por apresentarem vantagens em espectro de emissão estreito, baixa interferência biológica, capacidade de detectar diferentes compostos e possibilidade de detecção na ordem de pg devido ao aumento no sinal, como foi observado na quantificação de 0,6 pg/ml de aflatoxina M₁ em leite, no uso de espectroscopia fluorescente (LI; ZHANG; ZHANG, 2009 e HOLFORD; DAVIS; HIGSON, 2012).

Os sistemas de detecção que utilizam imunoenaios fluorescentes se desenvolveram com o propósito de monitorar substâncias químicas, tóxicas e agentes biológicos (LI et al., 2013). Os marcadores fluorescentes tornaram-se escolha de utilização em técnicas de imuno-histoquímica, que associam a detecção do agente tóxico ou etiológico de uma doença com a visualização de lesões microscópicas compatíveis com a presença desse agente no organismo, esta técnica de imunofluorescência permite a detecção e visualização mais clara e definida de estruturas celulares como núcleo, citoplasma e organelas, o que facilita a diferenciação e permite a identificação de alterações nessas estruturas, sendo promissora, por exemplo, no diagnóstico de infecções e na detecção de neoplasias em sua fase inicial (ROCHA et al., 2004 e GUEDES, 2010).

Na detecção de micotoxinas, a imuno-histoquímica se torna promissora na pesquisa destes compostos em tecidos animais. Sabe-se o quanto a contaminação por micotoxinas afeta a produtividade e a saúde animal, e é importante o desenvolvimento de técnicas que permitam tanto a detecção destes compostos, quanto a visualização dos seus efeitos tóxicos nos tecidos, assim é possível avaliar se o animal entrou em contato com a toxina, quais os principais órgãos atingidos e em qual grau de toxicidade, utilizando-se a mesma técnica padrão com a simples mudança de tratamento das lâminas. A limitação de coleta de amostras a campo, onde há problemas em conservar o tecido íntegro até proceder com as análises, é minimizada com a imuno-histoquímica, pois logo depois que se coleta as amostras, estas são fixadas em formol, assim os processos autolíticos são interrompidos, sendo conservadas por longos períodos em condições adequadas (GUEDES, 2010).

Os anticorpos podem ser empregados em cortes histológicos de tecidos processados pela técnica de inclusão em parafina, resina ou pelo método de congelamento, independente do método usado é importante preservar o antígeno no tecido, evitando modificações na sua conformação tridimensional ou composição química, a fim de permitir o correto reconhecimento do antígeno pelo anticorpo. Etapas de fixação e processamento do material são importantes para preservar as características dos antígenos, o fixador empregado deve preservar a morfologia tecidual e o antígeno, impedindo sua extração ou deslocamento durante o processamento do material. O formol e demais fixadores aldeídicos são utilizados na histologia pela eficiência na preservação do tecido, porém esses fixadores estabelecem ligações cruzadas com as proteínas teciduais, tornando-as insolúveis na forma de um gel, essas ligações formam uma malha que pode impedir a ligação do anticorpo ao antígeno presente no tecido, além de mudar a configuração tridimensional do antígeno, dificultando a ligação. Quanto mais tempo o tecido fica em contato com o fixador, mais ligações cruzadas

poderão ser formadas, por isso o controle do tempo de fixação é importante para a eficiência da técnica (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2014).

Para que ocorra a reação entre antígeno e anticorpo nos tecidos fixados por aldeídos, é necessário desfazer as pontes intermoleculares formadas durante a fixação, realizando o procedimento de recuperação antigênica, que consiste na utilização de mecanismos para recuperar os antígenos de um tecido através de métodos enzimáticos, com o uso de tripsinas e pepsinas, ou os métodos físico-químicos, como a sonicação ou aquecimento através do uso de panela de pressão, micro-ondas, entre outros, devendo o material ser imerso em solução tampão. A reação imuno-histoquímica deve ocorrer em temperatura e pH controlados, já que os anticorpos são imunoglobulinas que podem se desnaturar em condições extremas desses dois fatores, para que isso seja evitado, os cortes de tecido devem ser recobertos com solução tampão durante as lavagens. Para controle de temperatura das lâminas, estas devem ser mantidas em geladeira ou estufa dependendo da etapa da reação, temperaturas elevadas aceleram a reação entre antígeno e anticorpo, embora diminuam a especificidade, em contrapartida, temperaturas mais baixas diminuem a velocidade da reação e aumentam a especificidade do antígeno e anticorpo. Cada um dos fatores é importante para atingir o resultado esperado na reação de imuno-histoquímica, e deve ser levado em consideração durante a padronização do método (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2014).

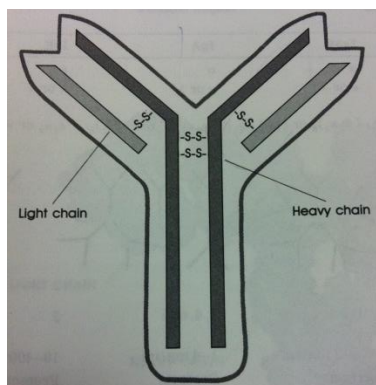
Solcan et al. (2013) avaliou por imuno-histoquímica o efeito protetor de *H. rhamnoides*, conhecido popularmente como espinaheiro do mar, nas lesões de fígado causadas por AFB₁ em frangos. O grupo 1 foi tratado com 54 µg/kg peso corpóreo/dia de AFB₁ por 28 dias, e o grupo 2 recebeu a mesma concentração de toxina em associação com 0,6 ml de óleo de *H. rhamnoides*/kg p.c/dia. Na análise histopatológica do fígado, foi identificado no grupo 1 áreas degenerativas e necróticas, congestão de vasos, formação de novos ductos da bile, infiltrado celular e intensa expressão de p53, Bcl-2 e COX-2, relacionados a processos inflamatórios, já no grupo 2, as lesões apresentadas foram menos intensas, com infiltrado inflamatório e moderada degeneração, as expressões de p53, Bcl-2 e COX-2 foram moderadas no hepatócito em comparação ao grupo 1, indicando que o óleo de *Hippophae rhamnoides* possui efeito hepatoprotetor nas aves.

2.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL

O componente central dos imunoenaios é o anticorpo, imunoglobulina secretada pelos linfócitos B em virtude da presença de substância estranha no organismo

(antígeno), a molécula consiste de glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 150 kDa, na forma de um tetrâmero com duas cadeias leves de 25 kDa e duas cadeias pesadas de 50 kDa idênticas (Figura 7) (HARLOW & LANE, 1988a).

Figura 7 – Estrutura geral da molécula de IgG.



Fonte: HARLOW & LANE, 1988a.

Antigamente, a produção de anticorpos ocorria pela inoculação de antígeno de interesse em ratos e camundongos, que através do sistema imunológico produziam anticorpos contra o determinado antígeno, os anticorpos eram retirados do animal pelo soro, porém esse método de produção é limitado pela própria capacidade de produção animal. A busca por técnicas de produção *in vitro* foi conduzida pela preocupação ética com os animais e pela maior eficiência na produção (HEILMANN et al., 2005).

A técnica de produção por hibridomas foi desenvolvida por Köhler e Milstein (1975), e permitiu a produção ilimitada de anticorpo monoclonal (AcM) com alta especificidade, uniformidade e afinidade por um único epítipo (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999). Células de hibridoma são fusões de células de mieloma e células de baço de camundongos imunizados, assim as primeiras garantem a viabilidade aos hibridomas por tempo indeterminado e as células de baço são produtoras dos anticorpos monoclonais de interesse (HEILMANN et al., 2005 e LI; ZHANG; ZHANG, 2009).

Moléculas com estrutura muito pequena, como as micotoxinas, não possuem atividade antigênica e, portanto, não ativam a produção de anticorpos por si só. Para a obtenção de AcM antimicotoxinas, é necessário a conjugação das toxinas com moléculas denominadas carreadoras, que são normalmente proteínas de maior massa molecular capazes de ativar o sistema imunológico (LI; ZHANG; ZHANG, 2009). Kawamura et al. (1988) produziram AcM anti-AFB₁ em camundongos BALB/c imunizados com conjugado AFB₁-BSA, obtendo células esplênicas secretora de IgG. Procedeu-se à fusão destes linfócitos

sensibilizados com células de mieloma linhagem SP2/0-AG14 para obtenção de hibridomas, que foram selecionados em meio HAT (meio *Dulbecco's modified Eagle's*, contendo 100 μM de hipoxantina, 0,4 μM de aminopterina e 16 μM de timidina) e avaliados por ELISA não-competitivo indireto para verificar a produção de AcM anti-AFB₁.

O soro animal ainda é utilizado no cultivo de células de hibridoma *in vitro*, o soro fetal bovino (SFB) é amplamente utilizado por prover fatores hormonais de estimulação e proteínas que transportam hormônios, minerais e lipídeos às células. Porém alguns problemas são associados ao seu uso, como falta de homogeneidade entre os lotes e alto conteúdo de proteínas, que dificultam o processo de purificação dos anticorpos, sendo assim, o ideal é diminuir sua concentração gradualmente no meio de cultura utilizado para o cultivo celular (LEGAZPI et al., 2005 e EVEN; SANDUSKY; BARNARD, 2006).

Uniformidade e propriedades constantes, associada à produção ilimitada de anticorpos pelos hibridomas estão entre as principais vantagens e justificativas do uso de técnicas imunológicas, o anticorpo monoclonal purificado normalmente terá somente um epítipo em sua molécula que se ligará à estrutura de interesse, conferindo alta especificidade (LI; ZHANG; ZHANG, 2009). O desenvolvimento de imunoenaios para detecção de micotoxinas em alimentos tem sido uma promissora alternativa de métodos de quantificação e triagem, visando redução no custo e no tempo de análise.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi produzir anticorpo monoclonal visando padronizar ic-ELISA para quantificar aflatoxina B₁ em fígado de frango, assim como desenvolver imuno-histoquímica fluorescente em tecido animal, tendo como modelo embrião de frango inoculado com AFB₁, avaliando a toxicidade *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar e manter hibridoma secretor de AcM IgG específico para aflatoxina B₁;
- Concentrar e purificar AcM IgG específico para aflatoxina B₁;
- Padronizar e validar intralaboratorialmente ic-ELISA para quantificação de AFB₁ em fígado de frango;
- Padronizar técnica imuno-histoquímica colorimétrica e fluorescente para detecção de aflatoxina B₁ em tecido de embrião de frango;
- Avaliar *in vivo* a toxicidade mediada por aflatoxina B₁ em embrião de frango.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Fluxograma Experimental

As metodologias utilizadas no decorrer da pesquisa estão apresentadas em formato de fluxogramas abaixo descritos. O detalhamento das etapas metodológicas consta nos capítulos I e II.

Figura 8 – Fluxograma de delineamento experimental total.

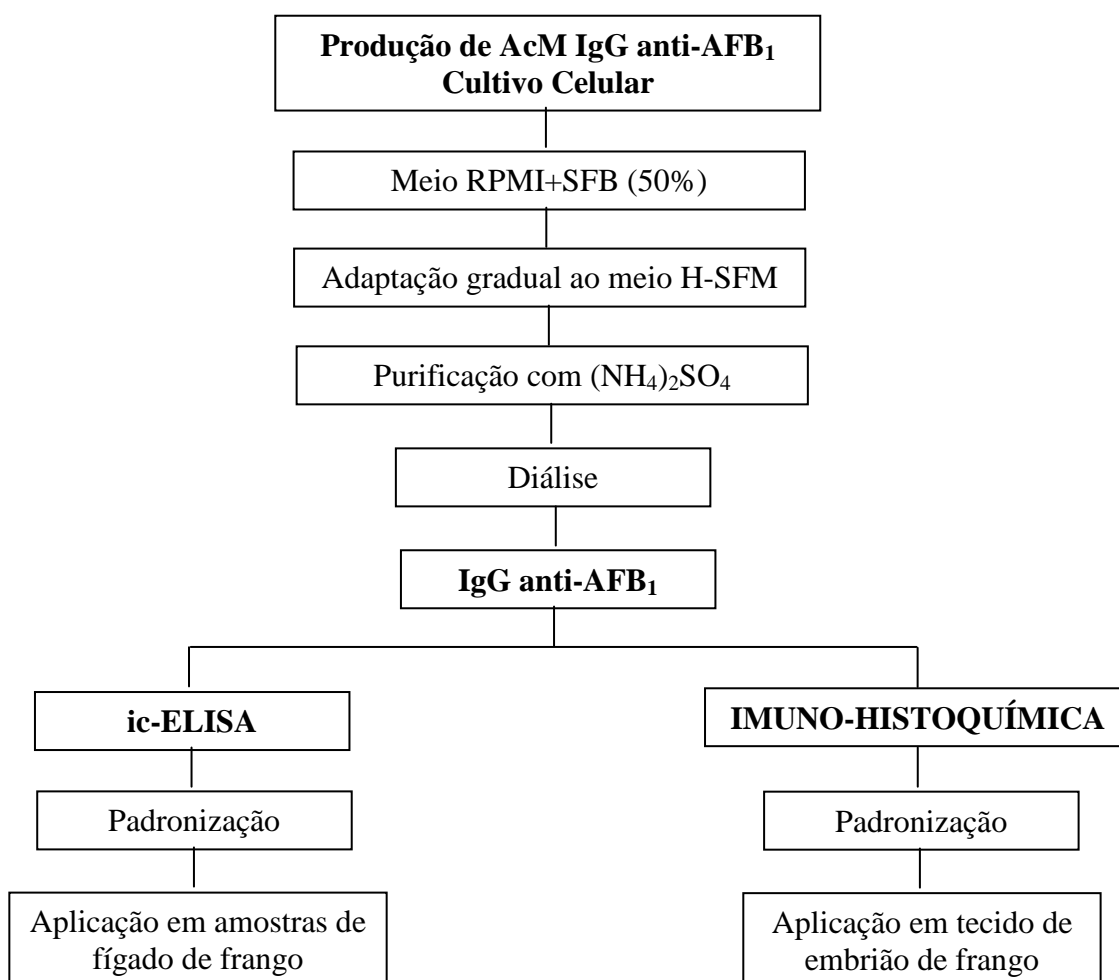


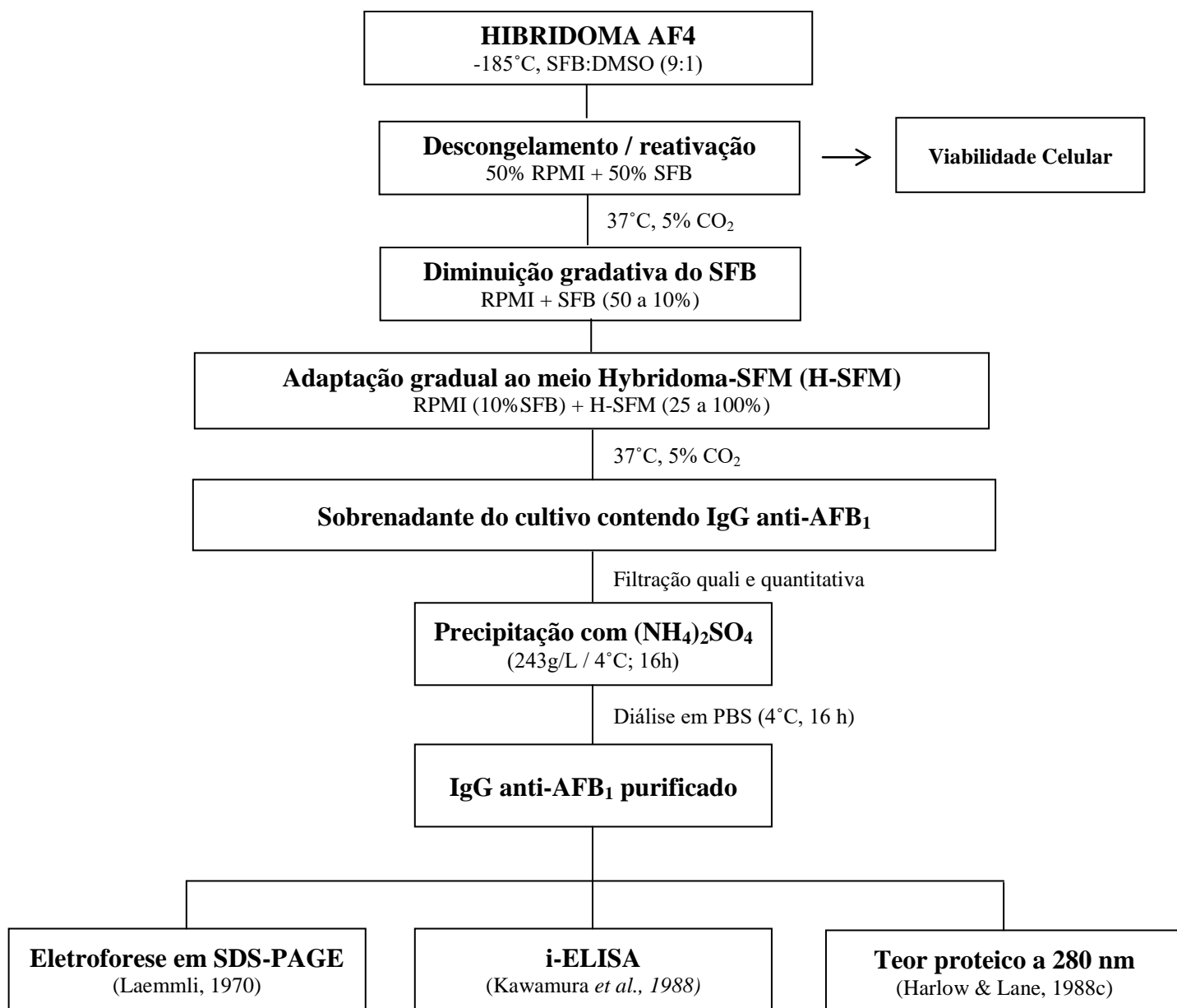
Figura 9 – Cultivo de hibridoma, produção e purificação de AcM anti-AFB₁.

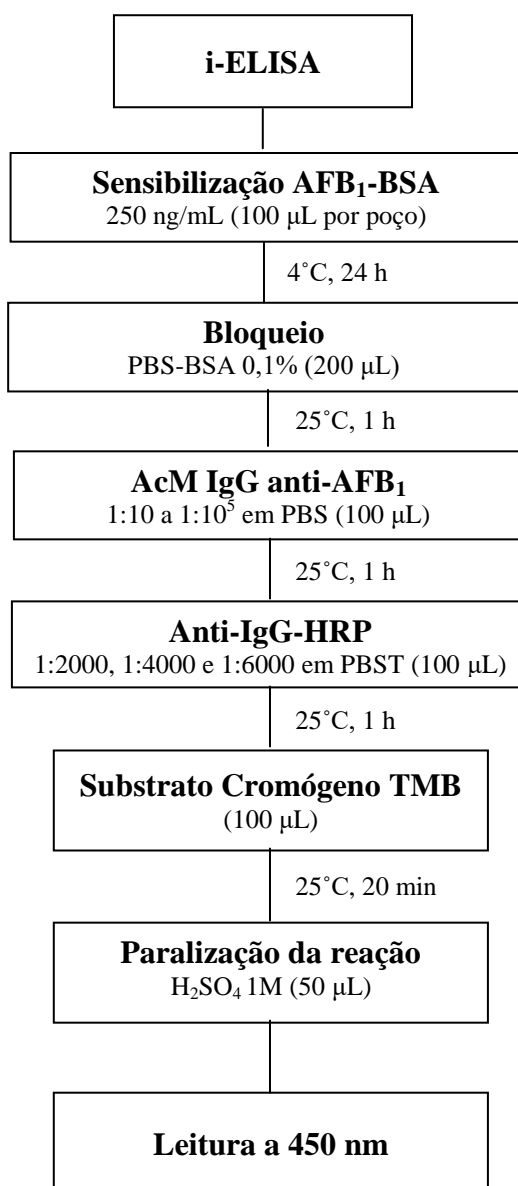
Figura 10 – Otimização de AcM anti-AFB₁ e conjugado anti-IgG-HRP por i-ELISA.

Figura 11 – Padronização ic-ELISA: curva de calibração e interferência da matriz (especificidade).

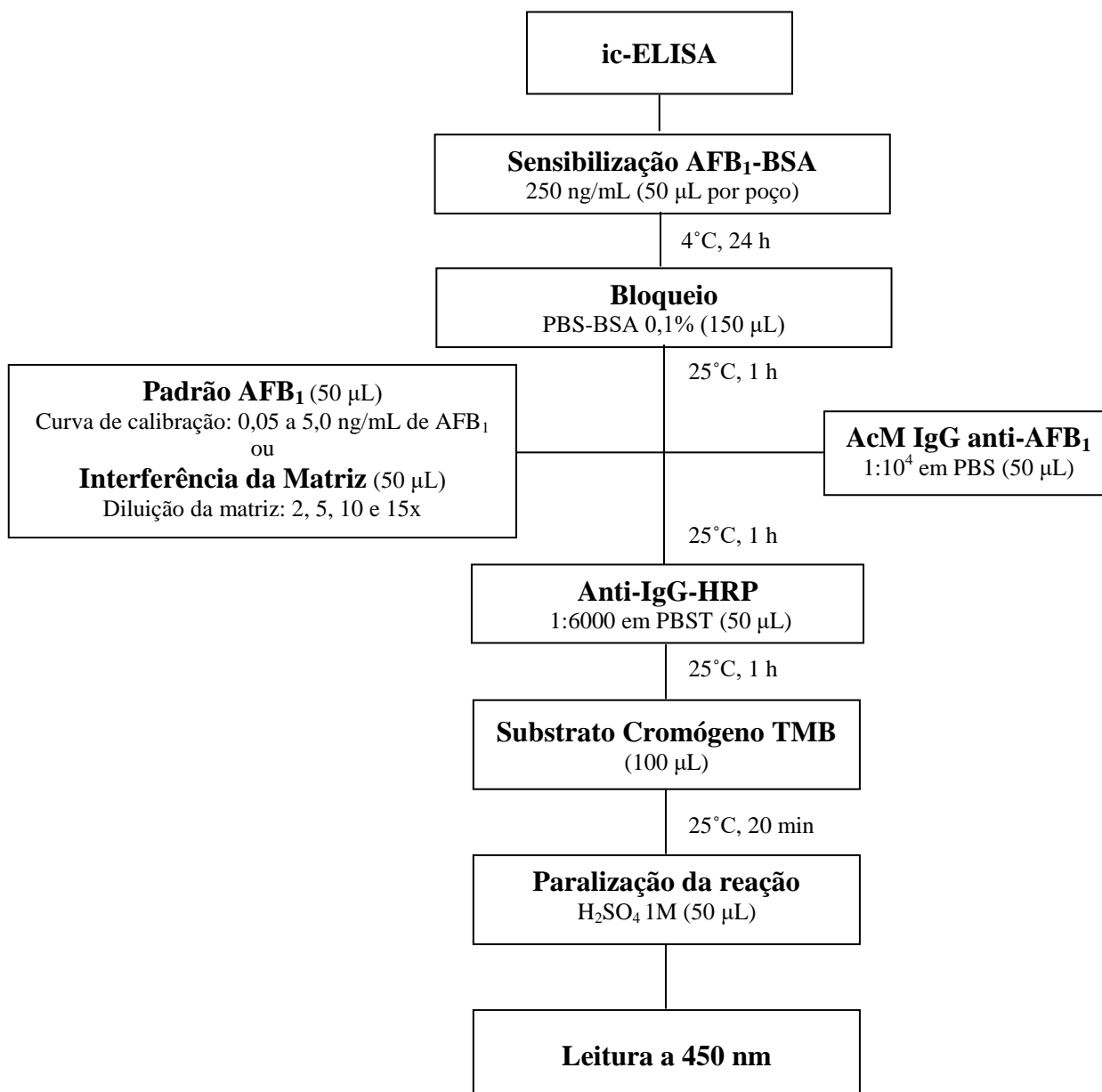


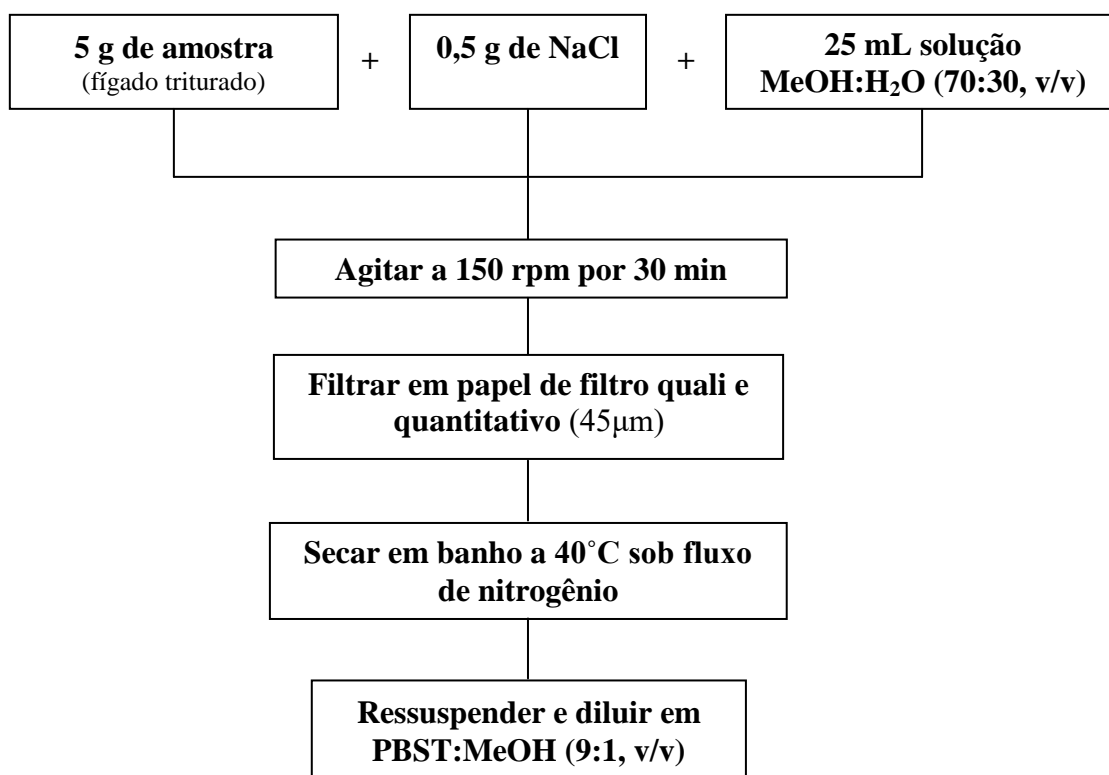
Figura 12 – Extração de AF na matriz alimentar.

Figura 13 – Validação intralaboratorial de ic-ELISA para análise de AFB₁ em fígado de frango (¹INMETRO, 2007.; ²CE nº 401/2006, 2006 e ³ANVISA, 2003).

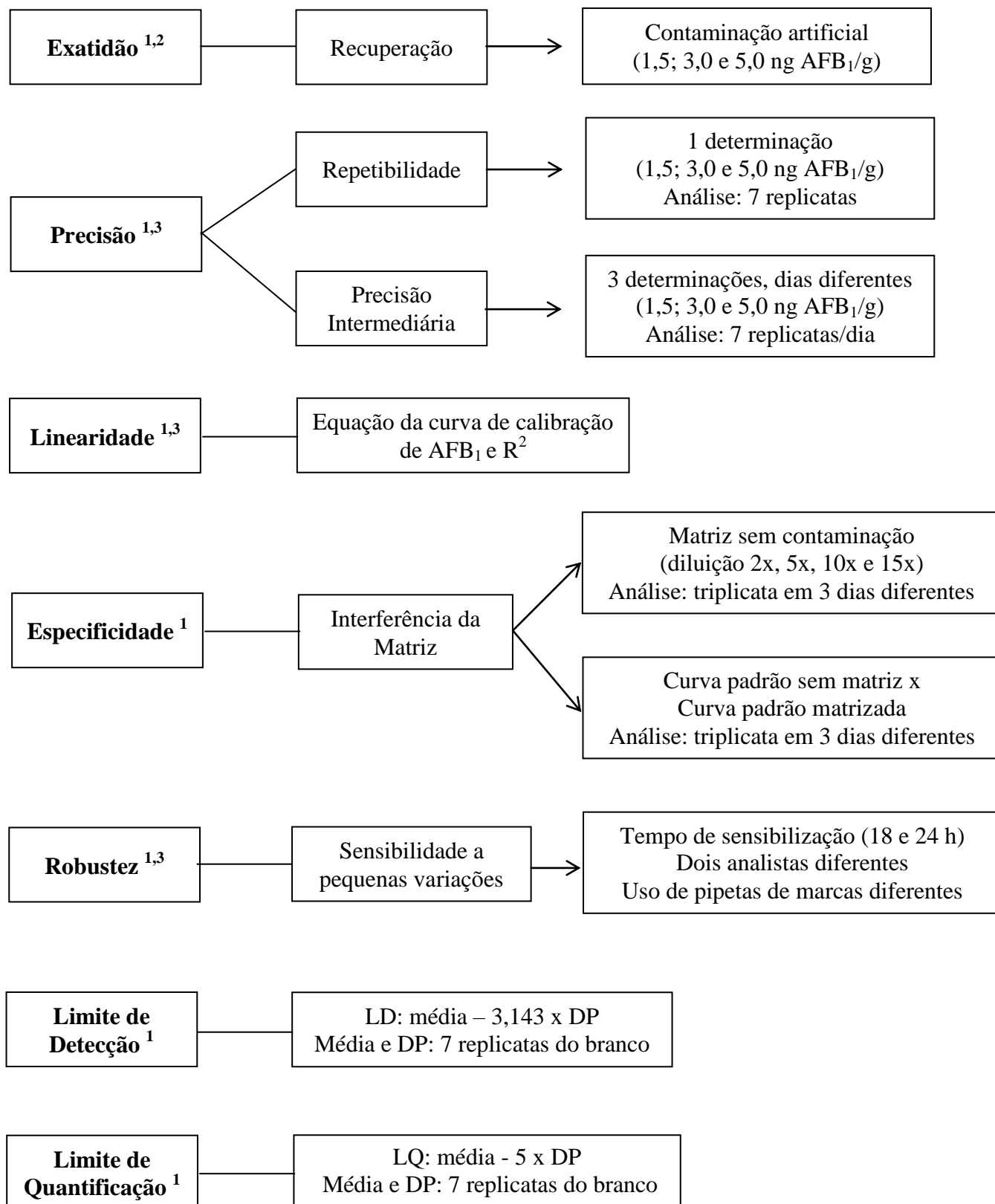


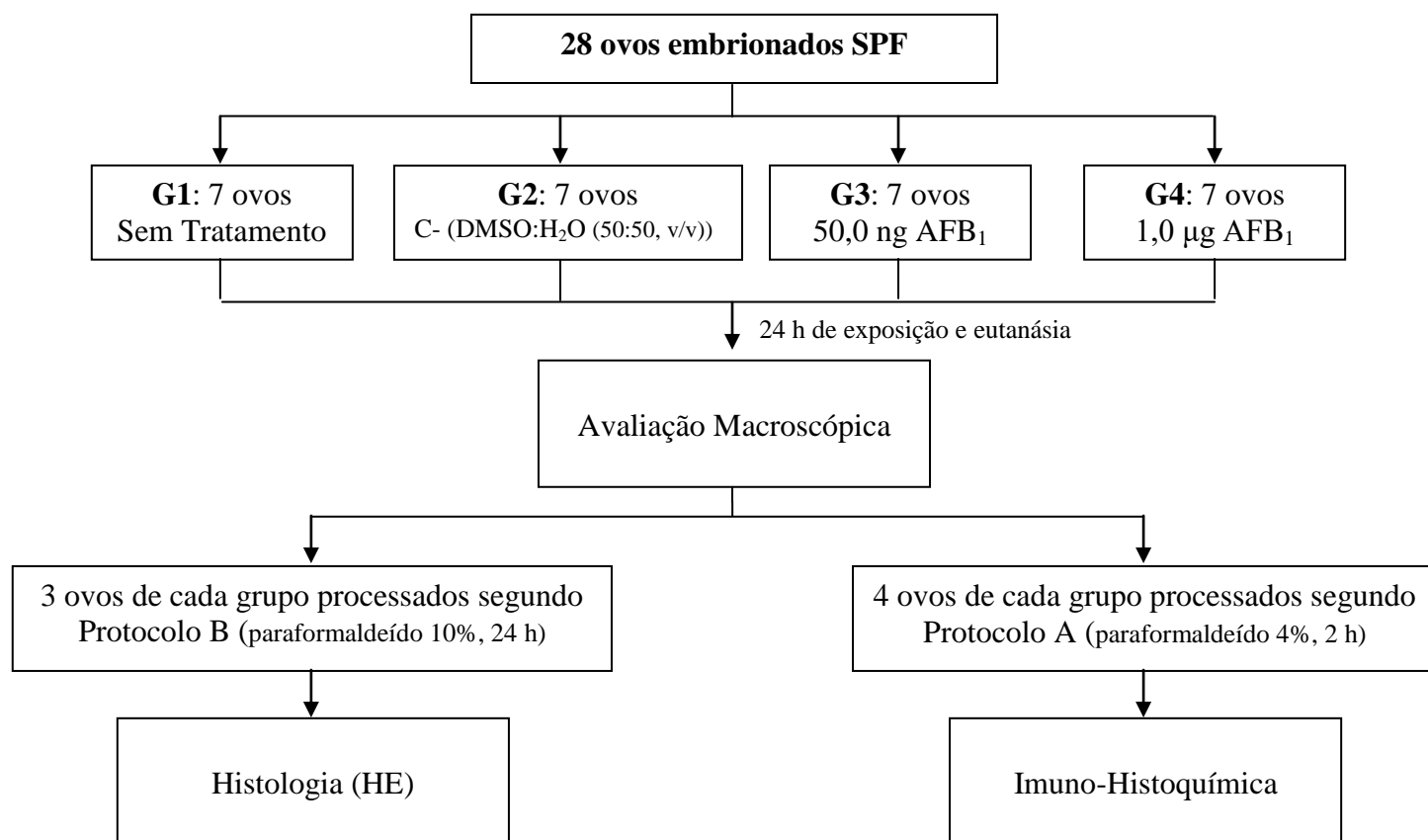
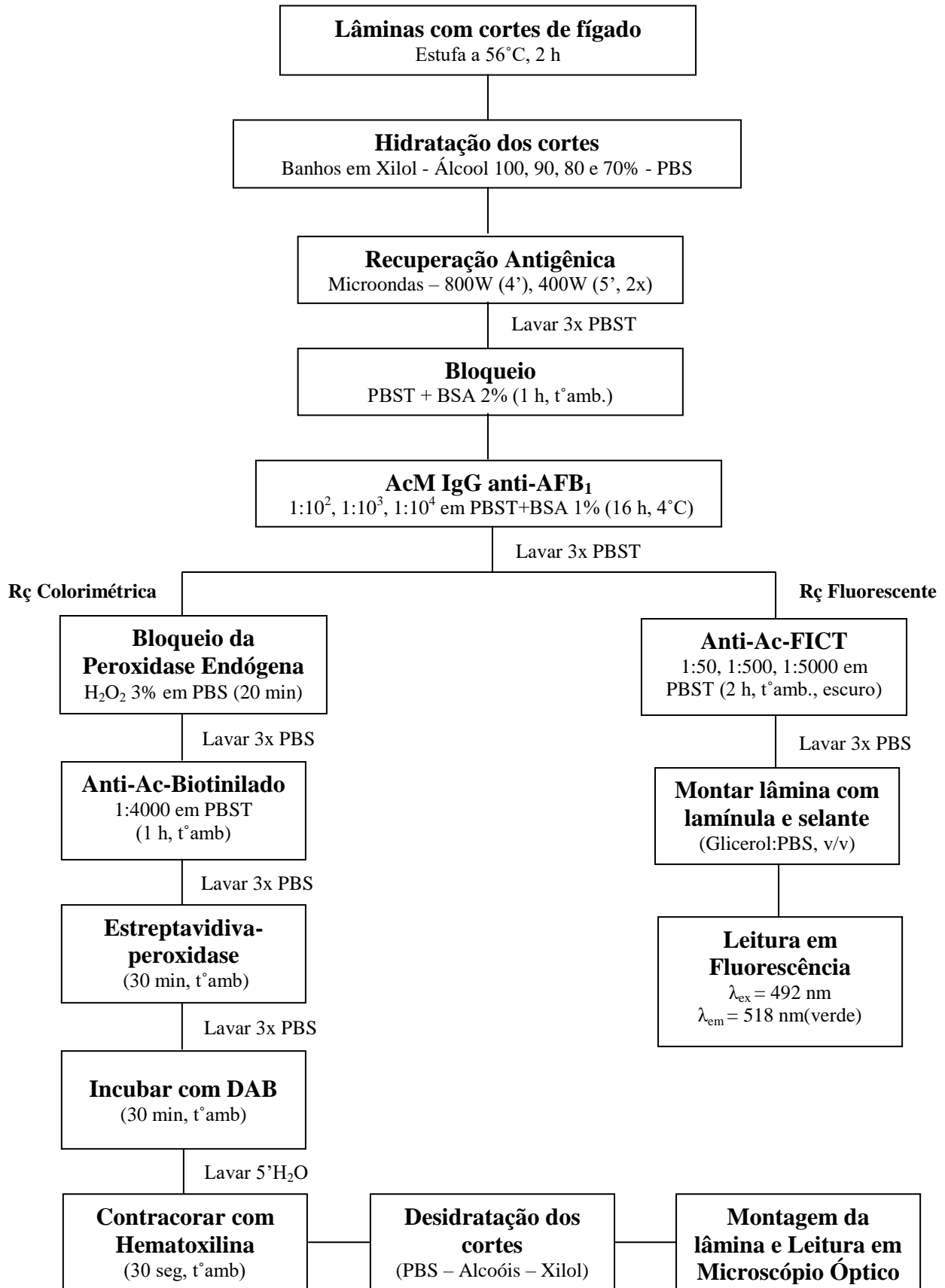
Figura 14 – Fase experimental conduzida com embriões de frango.

Figura 15 – Imuno-histoquímica colorimétrica e fluorescente.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos em forma capítulos, listados abaixo:

CAPÍTULO I:

Anticorpo monoclonal antiaflatoxina B₁ em ic-ELISA aplicado a material biológico

CAPÍTULO II:

Aflatoxina B₁: imunofluorescência *in situ* e toxicidade em embrião de frango

CAPÍTULO I

Anticorpo monoclonal antiaflatoxina B₁ em ic-ELISA aplicado a material biológico

Anticorpo monoclonal antiaflatoxina B₁ em ic-ELISA aplicado a material biológico. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Elisa Yoko Hirooka.

RESUMO

Aflatoxinas (AF), produzidas por determinadas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, são contaminantes de alimentos de consumo humano e animal, e reconhecidas pelos seus efeitos tóxicos e carcinogênicos. Efeito adverso na saúde e prejuízo na produção animal são relatados devido à ingestão de ração contaminada, os humanos também são afetados pelo consumo da carne e derivados, como leite e ovo contaminados. Técnicas imunológicas destacam-se na detecção de micotoxinas, por serem sensíveis, confiáveis e simples. Com enfoque no desenvolvimento de métodos imunquímicos, anticorpo monoclonal (AcM) antiaflatoxina foi produzido *in vitro*, através do cultivo de hibridoma linhagem AF4 em meio RPMI + 50% de soro fetal bovino (SFB), seguido de adaptação gradual ao meio H-SFM, resultando no total de 508,6 mg de anticorpo purificado. Aliquota de 555 µg/mL do AcM foi aplicado em ic-ELISA para quantificação de AFB₁ em fígado de frango, a um título de 1:10.000, associado ao anticorpo secundário diluído 1:6.000, demonstrando alta especificidade do anticorpo. Na validação intralaboratorial do ic-ELISA, a interferência de matriz não contaminada (fígado), foi avaliada no fator de diluição entre 2 e 15, sendo a diluição 5x escolhida pelo menor CV (14%) e melhor recuperação (100%). Em seguida, as curvas padrão na ausência e presença da matriz foram comparadas pela porcentagem de ligação de cinco pontos (0,05 ng/mL a 5,0 ng/mL), não obtendo diferença significativa ($p > 0,05$). A curva padrão de AFB₁ demonstrou linearidade adequada, expressa pela equação de regressão $y = -13,34 \ln(x) + 50,352$ e R^2 de 0,9917 ($p < 0,05$). As taxas de recuperação foram 90,5; 91,3 e 81,3% para 1,5; 3,0 e 5,0 ng/g, respectivamente. A precisão do método foi avaliada por repetibilidade (CV de 3,8; 4,6 e 4,0% para 1,5; 3,0 e 5,0 ng/g) e precisão intermediária (CV de 4,7; 7,0 e 5,0% para 1,5; 3,0 e 5,0 ng/g), estando todos os valores dentro dos limites preconizados pelas agências reguladoras. A robustez foi avaliada pela troca de analistas, instrumento (micropipeta) e tempo de sensibilização (18 e 24 h) da placa; o CV foi de 4 a 8% para sete curvas padrão realizadas por analistas diferentes, o CV médio obtido pela troca de instrumento e tempo de sensibilização foi de 5,2%, garantindo robustez para as três variáveis testadas. O limite de detecção foi de 1,2 ng/g e limite de quantificação de 1,5 ng/g. O AcM produzido permitiu o desenvolvimento de imunoenensaio com custo cerca de 160 vezes inferior aos kits comerciais, mostrando-se promissor na aplicação para triagem de AFB₁ em fígado de frango, com as vantagens de apresentar sensibilidade, especificidade e ser um método de fácil execução.

Palavras-chave: imunoenensaio, validação, fígado, frango

Monoclonal antibody anti-aflatoxin B₁ in ic-ELISA applied to biological material. 2016. Dissertation (Masters in Food Science) - Department of Food Technology, State University of Londrina, Londrina. Advisor Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka.

ABSTRACT

Aflatoxins (AF), produced by some fungi strains of the genus *Aspergillus*, are toxic contaminants in food and feed, and recognized by its toxic and carcinogenic effects. Adverse health effect and losses in animal production are reported due to ingestion of contaminated feed, humans are also affected by the consumption of meat and derivatives, such as contaminated milk and egg. Immunological techniques stand out for the detection of mycotoxins, due to its sensitivity, reliability and simplicity. Focusing on the development of immunochemical methods, monoclonal antibody (mAb) anti-aflatoxin was produced *in vitro*, by the cultivation of hybridoma lineage AF4 in RPMI medium + 50% fetal bovine serum (FBS), followed by gradual adaptation to H-SFM medium, resulting in a total of 508.6 mg of purified antibody. Aliquot of 555 µg/mL of mAb was applied in ic-ELISA for quantification of AFB₁ in chicken liver, at a titer of 1:10,000, associated with secondary antibody diluted 1:6,000, demonstrating high specificity of the antibody. Intralaboratorial validation of ic-ELISA was carried out by analysis of interference of uncontaminated matrix (liver), in a dilution factor from 2 to 15, the dilution 5x was selected because of the lowest CV (14%) and better recovery (100%). Then, the standard curves in the absence and presence of the matrix were compared by the percentage of binding of five points (0.05 ng/mL to 5.0 ng/mL), there was no significant difference between them ($p > 0.05$). The AFB₁ standard curve showed adequate linearity, expressed by regression equation $y = -13.34 \ln(x) + 50.352$ and R^2 equal to 0.9917 ($p < 0.05$). The recovery rates were 90.5; 91.3 and 81.3% for 1.5; 3.0 and 5.0 ng/g, respectively. Precision was evaluated by repeatability (CV of 3.8; 4.6 and 4.0% for 1.5; 3.0 and 5.0 ng/g), and intermediate precision (CV of 4.7; 7.0 and 5.0% for 1.5; 3.0 and 5.0 ng/g), the values found in this work are within the limits recommended by regulatory agencies. The robustness was evaluated by exchanging analysts, instrument (micropipette) and coating time (18 and 24 hours); CV ranged from 4 to 8% for seven curves performed by different analysts, the mean value of CV obtained by the exchange of instrument and coating time was 5.2%, ensuring robustness for the three variables tested. Limit of detection was 1.2 ng/g, and limit of quantitation was 1.5 ng/g. The mAb produced allowed the development of immunoassay with cost around 160 times lower than commercial kits, proving to be promising in application for AFB₁ screening in chicken liver, with the advantages of being sensitive, specific and easy to perform.

Key words: immunoassay, validation, liver, chicken

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne no Brasil ocupa espaço importante na economia nacional, o país é o segundo maior produtor de frango no mundo e é líder em exportações desta carne desde 2004, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016 e ABPA, 2015). A carne de frango tem destaque na região Sul, sendo os estados do Paraná e Rio Grande do Sul os principais fornecedores. O aumento na produtividade e conquista do mercado externo dependem de fatores importantes como o preço, sanidade e qualidade da carne.

Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos que se desenvolvem em grãos e chegam aos animais via alimentação pela ração contaminada, o monitoramento desses compostos é importante para assegurar a sanidade da carne, além de ser importante ferramenta para avaliar o quanto a qualidade da ração afeta a produtividade e a saúde animal. As micotoxicoses geram quadros clínicos agudos ou crônicos, a severidade depende do tipo de micotoxina, duração da exposição e dose, entre os principais efeitos observados, cita-se redução na taxa de crescimento e reprodução dos animais, diminuição na produção de ovos e efeitos tóxicos particulares de cada toxina (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

Aflatoxinas são destaque na avicultura, produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, sobretudo por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*, são consideradas mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas para humanos e animais, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) as classifica no grupo I como carcinógeno para o humano, primariamente atingindo o fígado (HUSSEIN; BRASEL, 2001; IARC, 2002; LEE et al., 2004 e CALLERI et al., 2007). São reconhecidas também pelo seu efeito imunossupressor, levando à ineficiência das vacinas utilizadas, e gerando perda por doenças mesmo para as quais as aves tenham sido vacinadas. (JAENISCH; CARON; SCHIMIDT, 2014).

A Legislação Brasileira é falha no controle de micotoxinas na alimentação animal, a Resolução n° 07, de 18 de fevereiro de 2011 contempla somente produtos destinados à alimentação humana, no caso animal, permanece em vigência a Portaria n° 07, de 09 de novembro de 1988, que determina os padrões mínimos de matéria prima destinada à alimentação animal, dentre as micotoxinas, somente a aflatoxina é contemplada, com limite máximo de 50 µg/kg. Na Comunidade Européia, a EC No 32/2002 estabelece os limites máximos de substâncias indesejadas na alimentação animal, contemplando dentre as micotoxinas, a aflatoxina B1, com limite máximo de 20 µg/kg.

Métodos de detecção de micotoxinas precisam ser sensíveis, específicos e confiáveis, pois são moléculas pequenas de difícil detecção. Técnicas imunológicas são importantes ferramentas para análise de micotoxinas, os anticorpos monoclonais (AcM) apresentam alta especificidade e afinidade por um único epítopo da molécula de interesse, além disso, é possível sua produção contínua e em larga escala, através do uso de hibridomas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

O uso de AcMs específicos e sensíveis permitiu o desenvolvimento de métodos imunológicos úteis na limpeza das amostras, como as colunas de imunoafinidade que impulsionaram a obtenção de extratos com baixos interferentes de matriz, e o ensaio ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para triagem de micotoxinas, facilitando e reduzindo a utilização de sistemas cromatográficos (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002).

Ensaio ELISA é rápido e apresenta alta especificidade, com limites de detecção comparáveis aos obtidos por métodos cromatográficos, capaz de detectar traços de um composto (ng ou pg) com pouca necessidade de limpeza e concentração do analito, dentre as desvantagens estão possíveis resultados falso positivos, pela reação cruzada de anticorpos, e falsos negativos, sendo a validação desse ensaio essencial para confiabilidade dos resultados (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002, FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004 e TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Com a obtenção contínua de anticorpos, novas possibilidades de biomarcadores se tornam viáveis, o desenvolvimento de ferramenta imunológica nacional para detecção de micotoxinas é uma oportunidade promissora de inovação tecnológica e minimiza a dependência por *kits* importados, assim o custo de análise será menor, gerando maior lucro e possibilidade de redução no custo do produto final.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O hibridoma linhagem AF4 secretor de AcM específico para AFB₁ (isotipo IgG₁ lambda), derivado de mieloma linhagem SP2/0-AG14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, foi gerado por Kawamura *et al.* (1988) em *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo* e, mantidas em *Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão*.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cultivo de hibridoma e produção de AcM específico para aflatoxina

2.2.1.1 Manutenção e recuperação de hibridoma

Os hibridomas, estocados a -185°C em nitrogênio líquido, foram recuperados por descongelamento rápido do criotubo em banho de água a 37°C , lavados com 10 mL de meio RPMI (Gibco Co., USA) a 37°C e centrifugados (200 xg, 6 min). Descartado o sobrenadante, uma alíquota de 50 μL da suspensão celular foi misturada a 50 μL da solução de corante vital Azul de Trypan (0,25 % em meio RPMI, p/v) e as células viáveis (refringentes, com citoplasma homogêneo e membrana íntegra) contadas em câmara de Neubauer (x100), a viabilidade celular pós-congelamento foi calculada e expressa em porcentagem:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{células viáveis pós-congelamento}}{\text{células viáveis} + \text{células mortas}} \times 100$$

Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI com 50 % de soro fetal bovino (Gibco Co., USA), 2 mM de glutamina, 23 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES e 1 ml de gamicina (40 mg/mL), para estimular a recuperação do hibridoma congelado. O cultivo ocorreu em microplaca de 24 orifícios a 37°C com 5% CO_2 , com diminuição gradativa de soro fetal bovino (SFB) até 10% no meio RPMI.

2.2.1.2 Produção de AcM IgG em meio sintético *Hybridoma*-SFM

Os hibridomas cultivados em meio RPMI com 10% de SFB (37°C , 5 % de CO_2) foram adaptados em meio *Hybridoma*-SFM (*serum free medium* H-SFM, Gibco Co., USA), adicionando gradualmente 25, 50, 75 e 100% de H-SFM suplementado com 2 mM de glutamina, 5000 U/mL de penicilina e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina (HEUSSNER, 2007; KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*).

A produção de AcM foi realizada em cultivo estático no meio H-SFM, efetuando a expansão celular para frascos de cultivo de 25, 75 e 150 cm^2 , até a quantidade requerida. O sobrenadante de cultivo contendo o AcM IgG antimicotoxina foi filtrado para remover o material celular. O volume total do sobrenadante foi avaliado quanto à concentração protéica a 280 nm e atividade anti-AFB₁ por i-ELISA.

2.2.1.3 Determinação de proteína (IgG)

A concentração protéica (IgG) foi determinada a 280 nm, adotando coeficiente de absorção (E_{280}) de 1,35 para IgG (HARLOW & LANE, 1988c):

$$\text{IgG (mg/mL)} = \frac{\text{absorvância a 280 nm}}{\text{coeficiente de absorção}}$$

2.2.1.4 Determinação de reatividade antimicotoxina por i-ELISA

IgG anti-AFB₁ produzido em meio *Hybridoma*-SFM foi determinado por i-ELISA (Ensaio imunoenzimático indireto), sendo o protocolo similar ao descrito por Kawamura et al. (1988). Microplacas de poliestireno (96 poços) foram sensibilizadas com 100 µL de AFB₁-BSA (250 ng/mL, tampão PBS 0,015 M, pH 7,4) e incubadas a 4°C por 24 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 200 µL de solução BSA 0,1% em PBS e incubadas por 1 h a 25 °C. Após 3 lavagens com PBST, foram adicionados 100 µL de sobrenadante do cultivo e incubadas a 25°C por 1 h. Após 3 lavagens com PBST, foram adicionados 100 µL de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* (HRP) diluído a 1:2000 em PBST e incubadas a 25°C por 1 h. Após 6 lavagens com PBST, adicionou-se 100 µL da solução de substrato cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina) por 20 min a 25°C, a reação enzimática foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 M e absorvância lida a 450 nm (leitora de ELISA, Bio-Tek Instruments ELX800, USA).

2.2.2 Purificação do anticorpo monoclonal IgG anti-AFB₁

2.2.2.1 Precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄

O sobrenadante filtrado contendo AcM anti-AFB₁ foi adicionado de (NH₄)₂SO₄ (243g/L) sob agitação lenta até concentração final de 50% de saturação para precipitação e purificação parcial de IgG. O sobrenadante foi mantido a 4°C por 16 h sob agitação, posteriormente foi filtrado e o precipitado proteico transferido para tubo limpo e mantido a -80° C (Kawamura, informação pessoal, *Kagawa University*).

2.2.2.2 Diálise de proteína

Para uso, o concentrado proteico precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi dissolvido em menor quantidade possível de PBS (adicionou-se 1-2mL de PBS para o precipitado oriundo de 500 mL de sobrenadante). A diálise (*cut-off* de 12000-16000 MM, tamanho 25 mm x 16mm) foi realizada empregando-se PBS (4 x 1 L) a 4° C por 16 h.

2.2.2.3 Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970), foi realizada para avaliar a pureza do anticorpo. Alíquota de 4,5 μL de AcM, correspondente a 2,5 μg de proteína, foi diluída em tampão de amostra 3 vezes concentrado e fervida em banho-maria por 3 min, posteriormente foi aplicada no gel paralelamente com 5 μL do padrão de marcador molecular (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, USA). O gel de concentração (*stacking*) foi de 5% de acrilamida, enquanto que o de corrida (*running*) foi de 10%. Após corrida por 2 h sob 80V, o gel foi corado com solução de *Coomassie blue* (Coomassie Brilliant Blue R, Sigma, St. Louis, Mo, USA) e descorado com ácido acético:metanol:água (1:4:5), para a visualização e distinção de bandas proteicas.

2.2.3 ELISA competitivo indireto (ic-ELISA)

2.2.3.1 Otimização de AcM anti-AFB₁ e conjugado anti-IgG-HRP

A diluição ótima de AcM para imunoenensaio foi determinada testando-se AcM anti-AFB₁ nas diluições de 1:10 a 1:10⁵ em PBS e, procedendo i-ELISA em três concentrações de conjugado anti-IgG-HRP: 1:2000, 1:4000 e 1:6000, em triplicata.

2.2.3.2 Procedimento

Ic-ELISA foi realizado seguindo o protocolo descrito por Kawamura *et al.* (1988) adaptado conforme nossa condição laboratorial. As microplacas foram sensibilizadas com 50 μL de AFB₁-BSA (250 ng/mL, Tampão PBS 0,015M pH 7,3) e incubadas a 4°C por 24 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 150 μL de solução BSA 0,1 % em PBS e incubadas por 1 h a 25°C. Após 3 lavagens com

PBST, adicionou-se 50 µL de padrões AFB₁ ou matriz de fígado, seguida de 50 µL AcM anti-AFB₁ produzido em H-SFM (1:10000 em PBS), procedendo reação em triplicata, sendo incubado a 25°C por 1 h. A placa foi lavada 3 vezes com PBST, adicionada de 50 µL de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* (1:10⁶ em PBST) e incubada a 25°C por 1 h. Após 6 lavagens com PBST, 100 µL da solução de substrato cromógeno TMB foi adicionado. Após 20 min a 25° C, a reação enzimática foi paralisada com 50 µL de H₂SO₄ 1M e a absorbância lida a 450nm.

A média de absorvâncias foi calculada a partir de valores individuais obtidos e os resultados expressos em porcentagem de ligação:

$$\% \text{ ligação} = (A^+/A^-) \times 100$$

Onde A⁺ corresponde à média de absorvância na presença de amostra ou padrão, enquanto que A⁻, a média da absorvância na ausência de toxina (controle negativo). A concentração de AFB₁ foi determinada pela curva padrão (0,05 a 5,0 ng/mL de AFB₁), plotando a porcentagem de ligação contra log da concentração de AFB₁.

2.2.3.3 Extração de AF na matriz alimentar

Testes preliminares para definir menor interferência de matriz e melhor recuperação foram conduzidos pela comparação de seis métodos de extração, um descrito em kit comercial e cinco em literatura (Stubblefield e Shotwell, 1931; Vilar; Oliveira; Stamford, 2002; Vilar; Oliveira; Stamford, 2002, modificado; Gathumbi et al., 2003; Anfossi et al., 2015). A extração de escolha foi o procedimento descrito por Vilar, Oliveira e Stamford (2002), com modificação. Alíquota de 5 g de amostra (fígado de frango triturado) foi adicionada de 0,5 g de NaCl e 25 mL de solução metanol grau HPLC:H₂O (70:30, v/v) e agitada a 150 rpm por 30 min, posteriormente foi filtrada qualitativamente, seguida de membrana de vidro de 45µm (Macherey-Nagel, Alemanha). Alíquotas de 500 µL do filtrado foram secas em banho a 40°C sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas em 500 µL de PBST:Metanol (9:1, v/v) e diluídas no mesmo solvente.

2.2.4 Validação intralaboratorial de ic-ELISA para quantificação de AFB₁

2.2.4.1 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da metodologia de recuperação. Foram utilizadas pelo menos três concentrações que estavam dentro da faixa linear, sendo realizadas três repetições, analisadas em triplicata (Regulamento (CE) nº 401/2006, 2006; INMETRO, 2007).

2.2.4.2 Precisão

A precisão foi avaliada por repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada pela precisão intracorrída, avaliada através de três concentrações analisadas, em sete replicatas no mesmo dia. Precisão intermediária foi realizada pela precisão inter-corrída, avaliada através de três concentrações analisadas, em sete replicatas em três dias diferentes (ANVISA, 2003 e INMETRO, 2007).

2.2.4.3 Linearidade

A linearidade está apresentada pela equação de regressão linear e coeficiente de determinação (R^2) utilizando pelo menos cinco pontos da curva de calibração (ANVISA, 2003 e INMETRO, 2007).

2.2.4.4 Especificidade

A especificidade foi realizada pelo estudo da interferência da matriz sem contaminação, em que foi comparado a % de ligação da matriz (50 μ L matriz diluída + 50 μ L do AcM 1:10⁴) em relação a % ligação do AcM (50 μ L metanol:PBST (1:9, v/v) + 50 μ L do AcM 1:10⁴). As soluções do extrato da matriz foram diluídas 2x, 5x, 10x e 15x em metanol:PBST (1:9, v/v). Posteriormente, comparou-se a curva padrão na presença da matriz, em que os pontos da curva foram solubilizados no extrato da matriz diluído pelo fator pré-definido, com a curva padrão na ausência da matriz, em que os pontos da curva foram solubilizados em metanol:PBST (1:9, v/v). Dois métodos de comparação foram usados, de acordo com o INMETRO (2007), sendo eles a análise de médias pelo teste *t* (*Student*) e a análise dos desvios entre curva de referência e a curva matrizada – % de interferência (INMETRO, 2007).

2.2.4.5 Robustez

Robustez foi avaliada pela execução de curvas padrão por dois analistas diferentes, variação no tempo de sensibilização da placa (18 e 24 h), e uso de duas pipetas de marcas diferentes para preparo das soluções de AcM anti-AFB₁ e anti-IgG-HRP (ANVISA, 2003 e INMETRO, 2007).

2.2.4.6 Limite de detecção e quantificação

Limite de detecção do método (LD) foi determinado pelo cálculo da média do branco subtraída de 3,143 vezes o desvio padrão. Média e desvio padrão do branco foram obtidos em sete replicatas (INMETRO, 2007).

Limite de quantificação (LQ) foi definido pelo cálculo da média do branco subtraída de 5 vezes o desvio padrão. Média e desvio padrão do branco foram obtidos em sete replicatas (INMETRO, 2007).

2.2.5 Análise Estatística

Os dados paramétricos gerados na validação do ic-ELISA foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey, considerando-se nível de significância de 5%, através software Statistica v.10 (StatSoft[®], USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE ACM ANTI-AFB₁ ATRAVÉS DE CULTIVO DE HIBRIDOMA AF4

O hibridoma AF4 foi gerado por Kawamura *et al.* (1988), conjugando AFB₁ com BSA. Através da análise por ic-ELISA, o AcM IgG anti-AFB₁ apresentou reatividade cruzada com AFB₁ de 100%; AFB₂ de 2,3%; AFG₁ de 3,4%, AFG₂ de 2,4%, entre outros análogos, o que demonstra a especificidade imunológica do AcM produzido (Tabela 1).

O hibridoma AF4 foi cultivado em meio RPMI com 50% de SFB, seguido de adaptação gradativa ao meio H-SFM até 100%, condição considerada ideal para purificação, visto que esse meio não necessita de suplementação com SFB, diminuindo o teor de proteínas naturalmente presentes no soro, assim reduz-se o conteúdo de interferentes no

processo de purificação, bem como na padronização de imunoenaios (HARLOW & LANE, 1988c; LEGAZPI et al., 2005 e EVEN; SANDUSKY; BARNARD, 2006).

Tabela 1 - Reatividade cruzada de AcM produzido pelo hibridoma AF4.

Aflatoxina	% Reatividade Cruzada
	AF4
B ₁	100
B ₂	2,3
G ₁	3,4
G ₂	2,4
AFL I ^a	14,1
AFL II ^b	122
M ₁	4,5
Q ₁	10,8
P ₁	>1,3
B _{2a}	>1,3

^a AFL I, isômero natural [1S]-aflatoxicol

^b AFL II, isômero natural [1R]-aflatoxicol

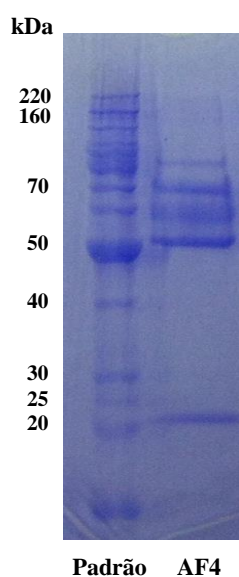
Fonte: KAWAMURA *et al.*, 1988.

O volume total de sobrenadante produzido em meio H-SFM foi de 12 litros. A purificação de AcM seguiu por processos de filtração, precipitação com sulfato de amônio, cujo método é comumente utilizado para remover proteínas da solução por *salting out*, por se tratar de sal com alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade (LIMA et al., 2008), e por diálises do AcM precipitado em soluções de PBS, o volume total do dialisado obtido foi de 346 mL. A concentração proteica (IgG) do dialisado, determinada a 280 nm (HARLOW & LANE, 1988c), foi de 1,47 mg/mL, obtendo-se no total 508,6 mg de anticorpo. O dialisado foi dividido em alíquotas de 10 mL e congelado a -20°C, para uso nos imunoenaios uma alíquota com concentração equivalente a 555 µg/mL foi utilizada.

Na eletroforese segundo método de Laemmli (1970), o detergente desnaturante SDS dissocia proteínas nas suas subunidades individuais e conseqüentemente elimina as estruturas secundárias e terciárias, já o mercaptoetanol quebra as pontes de dissulfeto, separando cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas (CHIOU & WU, 1999). Na Figura 1 visualiza-se uma banda equivalente a aproximadamente 25 kDa e outra de aproximadamente 50 kDa decorrentes da quebra das moléculas de IgG, que consiste em uma glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 150 kDa, na forma de um tetrâmero com duas cadeias leves de 25 kDa e duas cadeias pesadas de 50 kDa idênticas (HARLOW &

LANE, 1988a). A quebra incompleta pode manter a cadeia leve unida à pesada, resultando em banda equivalente à 75 kDa, assim como a falta de quebra pode manter a molécula de IgG intacta, resultando em banda equivalente à 150 kDa. A presença das bandas equivalentes às cadeias leves e pesadas de IgG comprova a obtenção de anticorpos monoclonais a partir do hibridoma AF4 em meio H-SFM.

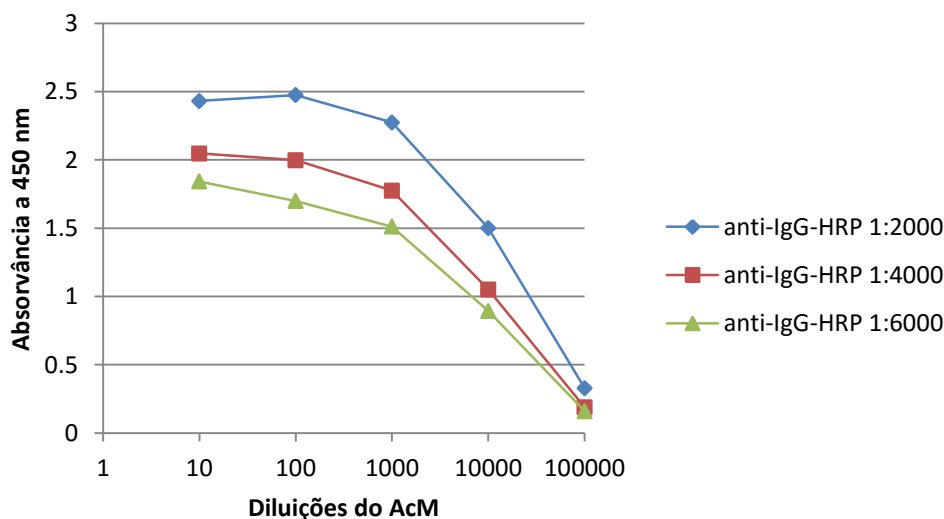
Figura 1 – Perfil eletroforético pós-diálise de AcM IgG anti-AFB₁ em SDS-PAGE.



3.2 OTIMIZAÇÃO DE ACM ANTI-AFB₁ E CONJUGADO ANTI-IGG-HRP POR I-ELISA

Para confirmação da atividade anti-AFB₁ do AcM e para desenvolvimento e padronização de ic-ELISA, foi realizado i-ELISA para determinar os títulos de AcM e de anti-IgG-HRP a serem utilizados. A Figura 2 mostra as diluições de 1:10 a 1:10⁵ de AcM testadas com concentrações de 1:2000, 1:4000 e 1:6000 de anti-IgG-HRP.

A melhor precisão é definida para diluição do AcM mais próximo do necessário para atingir 50% de ligação em relação a concentração inicial, sendo o parâmetro denominado IC_{50} (Inhibition Concentration at 50%), normalmente utilizado para expressar a sensibilidade do imunoenensaio (NUNES, 2005). Sendo assim, observa-se que a diluição 1:10⁴ de AcM apresentou valor médio de absorvância próximo de 50% de ligação em todas as diluições de anti-IgG-HRP testadas, com valores de $A=1,502$ (61,8% de ligação) para 1:2000 de anti-IgG-HRP; 1,051 (51,3% de ligação) para 1:4000 de anti-IgG-HRP; e 0,8945 (48,5% de ligação) para 1:6000 de anti-IgG-HRP.

Figura 2 – Perfil do título de AcM anti-AFB₁ e conjugado anti-IgG-HRP.

A diluição de anti-IgG-HRP a ser utilizada foi definida com base nos valores médios de absorvância encontrados quando utilizado AcM na diluição 1:10⁴. Na diluição 1:6000, o valor médio de absorvância obtido (0,8945) foi satisfatório por estar mais próximo dos valores ideais de absorção, entre 0,2 e 0,8, para evitar desvios na Lei de Lambert-Beer (SKOOG; WEST; HOLLER, 1992), além de reduzir a quantidade de reagente utilizado, minimizando o custo final da reação.

3.3 PROCEDIMENTO IC-ELISA

Inicialmente, o ic-ELISA era realizado utilizando 100 µl de conjugado AFB₁-BSA e de anticorpo secundário, e 200 µl de solução bloqueio. A redução no volume para 50 µl de conjugado e anticorpo, e 150 µl de solução bloqueio, demonstrou melhor linearidade da curva padrão, expressa por coeficiente de determinação (R²) (Tabela 2). Assim como, o emprego de menor quantidade de reagentes reduziu o custo final da reação, conforme comparação com o valor do kit comercial (Tabela 3).

Tabela 2 – Otimização do procedimento de ic-ELISA.

	Volume Preconizado (µL)	Volume Modificado (µL)
AFB ₁ -BSA	100	50
PBS-BSA 0,1%	200	150
Anti-IgG-HRP	100	50
R ²	0,9875	0,9917

Tabela 3 – Comparação de valores entre ic-ELISA desenvolvido e Kit comercial.

Reagente	Ic-Elisa desenvolvido*	Kit-Comercial
AFB ₁ -BSA	R\$ 0,90	
BSA	R\$ 0,55	
AcM IgG anti-AFB ₁	**	-
Anti-IgG-HRP	R\$ 1,00	
Placa de 96 poços	R\$ 10,00	
Valor total	R\$ 12,45	R\$ 2.080,00

*Custo por placa de 96 poços

** Valor considerado irrisório por estar abaixo de R\$ 0,01

É importante ressaltar que embora o custo do AcM usado em uma placa de ic-ELISA seja irrisório (abaixo de R\$ 0,01), deve-se considerar que a manutenção do cultivo de hibridoma AF4 e purificação de AcM gerou um custo de aproximadamente R\$ 1.500,00 com total obtido de 508,6 mg de AcM, suficiente para aproximadamente um milhão e oitocentas mil placas de 96 poços de ic-ELISA.

3.4 EXTRAÇÃO DE AF NA MATRIZ ALIMENTAR

Diferentes métodos de extração foram comparados quanto à interferência da matriz e recuperação para um valor fixo de AFB₁ (5,0 ng/g), os dados estão descritos na Tabela 4. Nos métodos cuja melhor diluição foi equivalente à 50x, não foi testada a recuperação, visto que a diluição da matriz resultaria em alto LQ (próximo a 12,5 ng/g), inviável para este estudo já que os níveis de contaminação de AFB₁ em fígado de frango encontrados na literatura variam de 0,54 a 5,8 ng/g (STAMFORD et al., 2005, VILAR; OLIVEIRA; STAMFORD, 2002 e SALLE et al., 2001).

Tabela 4 – Teste de extração de AFB₁ em fígado de frango.

Método de Extração	Diluição*	Interferência da Matriz (%)**	Recuperação (%)	Referência
1	50x	10,0	***	Vilar; Oliveira; Stamford (2002)
2	50x	18,9	***	Stubblefield e Shotwell (1931)
3	50x	15,8	***	Anfossi et al. (2015)
4	Puro	14,5	121,0	Gathumbi et al. (2003)
5	5x	4,1	25,8	Kit comercial
6	5x	9,8	100,0	Vilar; Oliveira; Stamford (2002), modificado

*Diluição equivalente à menor interferência da matriz, desde que CV < 15%;

** Resultados expressos em % da média de três repetições analisadas em triplicata;

***Não foi testada a recuperação, pois o LQ do método na diluição 50x seria próximo de 12,5 ng/g, inviável para este estudo.

Os testes de recuperação, conduzidos para os três métodos com diluição da amostra igual ou menor a 5x, apresentaram taxas de recuperação equivalentes a 121%, 26% e 100% para os métodos denominados 4, 5 e 6, respectivamente. Sucintamente, a principal diferença entre eles é extração com metanol:acetona (50:50, v/v) por agitação magnética (30 min), seguida de centrifugação no método 4, enquanto que nos métodos 5 e 6 o solvente extrator é metanol:H₂O (70:30, v/v), seguido de agitação em vórtex (2 min) ou agitação a 150 rpm (30 min) para os os métodos 5 e 6, respectivamente.

O nível aceitável de recuperação para concentrações de AFB₁ entre 1 e 10 µg/kg está entre 70 e 110% (EC 401, 2006), portanto o método de extração de escolha para este estudo foi segundo Vilar, Oliveira e Stamford (2002), com modificações (adição de 0,5 g de NaCl), que apresentou recuperação dentro dos parâmetros da legislação.

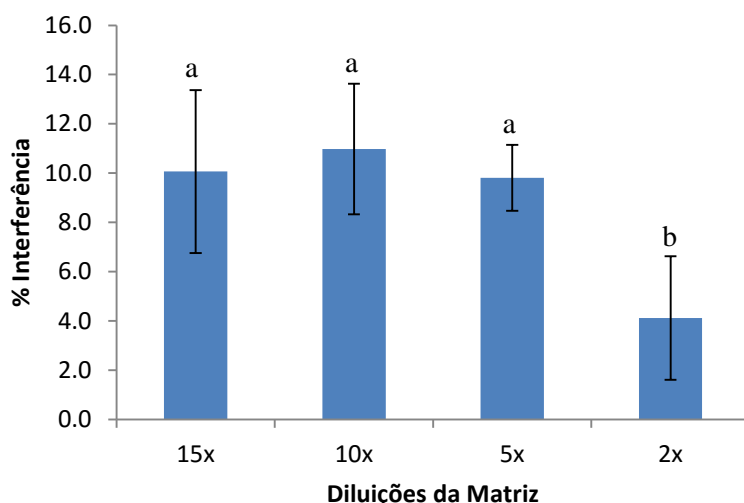
3.5 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE IC-ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AFB₁ EM FÍGADO DE FRANGO

A interferência de matriz é um parâmetro importante a ser avaliado quando se trata de alimentos, por ser uma matriz complexa composta de macro e micronutrientes, e quando se trabalha com imunoenaios, devido às reações falso-positivas que podem ser geradas pela matriz. Nas reações falso-positivas há uma diminuição do desenvolvimento da cor, que pode sugerir a presença do analito, isso ocorre quando a atividade enzimática é inibida pela presença de interferentes da amostra; quando a matriz prejudica a ligação adequada entre o analito (antígeno) e o anticorpo, ou ambos os fenômenos acontecendo simultaneamente (FOSTER; EISENSTADT; MILLER, 1983 *apud* LEE et al., 2004 e CAMPBELL et al., 1990 *apud* LEE et al., 2004).

A especificidade foi avaliada primeiramente pela interferência da matriz sem contaminação, observa-se na Figura 3 que a diluição 2x apresentou menor interferência de matriz entre as testadas ($p < 0,05$), com valor médio de 4,1% \pm 2,51 e poderia ser a de escolha para este estudo, a não ser por dois fatores importantes na validação que são comprometidos por essa diluição, sendo eles o coeficiente de variação elevado (CV = 61%), quando se recomenda CV abaixo de 15% (ANVISA, 2003) e baixa recuperação, com valores médios de 28,2% para amostra contaminada com 5,0 ng AFB₁/g de fígado, sendo o aceitável entre 70 e 110% (EC 401, 2006). O fato de a menor diluição ter apresentado a menor interferência de matriz pode ser explicado pela integridade do anticorpo monoclonal, que é mantida pela proteção inerente de proteínas do fígado de frango que estão presentes na matriz,

por outro lado, a diversidade e quantidade de proteínas presentes geram alto desvio padrão pela baixa homogeneidade da matriz.

Figura 3 – Interferência da matriz em ic-ELISA para determinação de AFB₁ em fígado de frango.



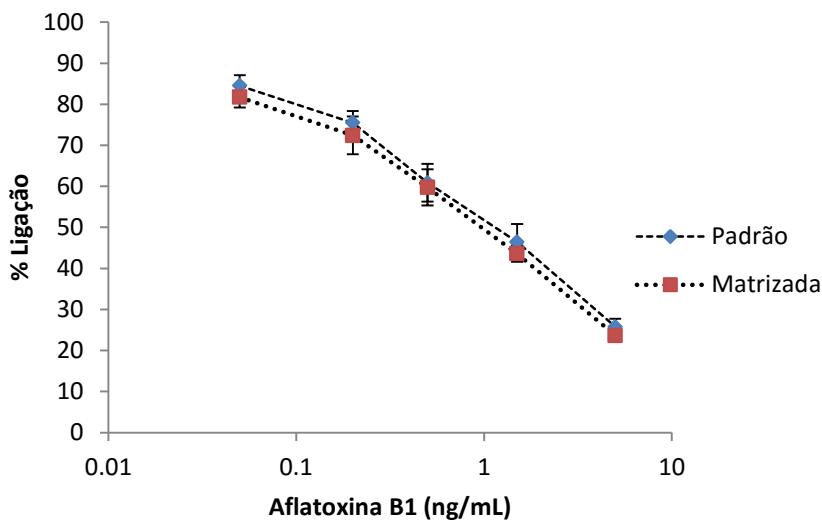
Resultados expressos em médias de % de interferência, n=12.

^{a-b} Diferença significativa ($p < 0,05$, one-way-ANOVA).

As diluições equivalentes a 15x, 10x e 5x não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), com valores médios de interferência de $10,1\% \pm 3,30$ (CV = 33%); $11,0\% \pm 2,65$ (CV = 24%) e $9,8\% \pm 1,33$ (CV = 14%) respectivamente. A diluição equivalente à 5x foi escolhida por apresentar coeficiente de variação dentro do especificado pela legislação, e por garantir boa recuperação, com valor médio de 100,0% para amostra contaminada com 5,0 ng AFB₁/g de fígado em ensaios preliminares.

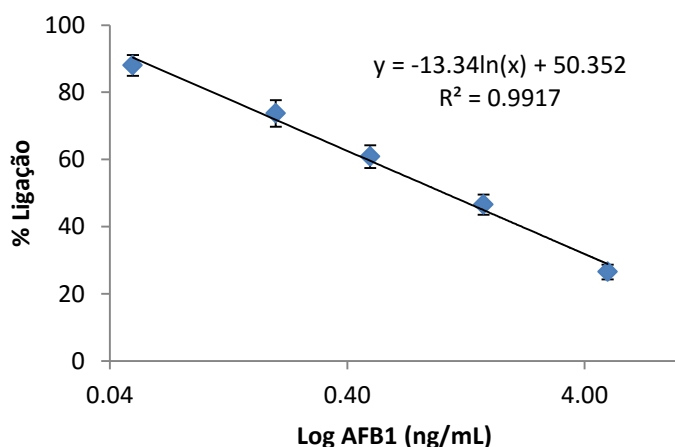
Definida a diluição de 5x para a matriz, foram comparadas as curvas padrão na ausência e na presença da matriz. A Figura 4 representa o método de comparação pela análise dos desvios (INMETRO, 2007), verifica-se que há sobreposição dos desvios para todos os pontos analisados (0,05 ng/mL a 5,0 ng/mL) entre a curva padrão na ausência da matriz e a curva matrizada - % interferência, evidenciando similaridade entre elas, fato este comprovado pela análise de médias pelo teste *t* (*Student*), em que não houve diferença significativa entre os pontos analisados de ambas as curvas ($p > 0,05$).

Figura 4 - Análise de desvios entre curva padrão e matrizada para determinação de AFB₁ em fígado de frango. Quadrados e losangos representam a média de % ligação de três curvas padrão realizadas em triplicata em dias diferentes. Barras representam o desvio padrão.



A linearidade foi avaliada pela curva de calibração com padrões de AFB₁ que foram previamente quantificados em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S22, UK), empregando comprimento de onda de 360 nm e coeficiente de absorvidade molar de 21.800 M⁻¹ L⁻¹ cm⁻¹ (IAL, 2008). A curva de calibração consistiu em cinco pontos variando de 0,05 ng/mL a 5,0 ng/mL (Figura 5), com equação de regressão expressa em $y = -13.34 \ln(x) + 50.352$ e R² igual a 0,9917 ($p < 0.05$), os resultados confirmam a linearidade do método.

Figura 5 – Curva padrão para detecção de AFB₁ por ic-ELISA. Losangos representam a média de % ligação de sete curvas padrão realizadas em dias diferentes. Barras representam o desvio padrão.



O teste de recuperação de AFB₁ permitiu avaliar a exatidão do método, amostras contendo 5 g de fígado triturado foram adicionadas de soluções de AFB₁ nas concentrações de 1,5; 3,0 e 5,0 ng/g, homogeneizadas em vortex e armazenadas *overnight* a 8°C antes da extração. As taxas de recuperação estão descritas na Tabela 5, amostras de fígado contaminadas com 1,5 ng/g foram quantificadas com valor médio de 1,4 ng/g ± 0,07, a recuperação variou de 85,2 a 93,9% (média de 90,5%), para amostras contaminadas com 3,0 ng/g obteve-se valor médio de 2,9 ng/g ± 0,13, com recuperação de 92,3 a 101,1% (média de 96,5%) e amostras contendo 5,0 ng/g de AFB₁ obtiveram valor médio de 4,1 ng/g ± 0,12, com recuperação de 78,7 a 83,2% (média de 81,3%). Nas três concentrações avaliadas, as taxas de recuperação estão dentro do valor recomendado de 70 a 110% para concentrações de AFB₁ entre 1 e 10 µg/kg (CE n° 401/2006, 2006).

Tabela 5 – Recuperação de AFB₁ em amostras de fígado de frango por ic-ELISA.

AFB ₁ adicionada (ng/g)	Média ± DP* (ng/g)	CV (%)	Recuperação (%)	Valor de Referência** (%)
1,5	1,4 ± 0,07	5,1	90,5	
3,0	2,9 ± 0,13	4,6	96,5	70 a 110%
5,0	4,1 ± 0,12	2,9	81,3	

* Resultados expressos em média ± DP de três repetições analisadas em sete replicatas.

** Segundo Regulamento (CE) n° 401/2006, 2006.

Os valores de recuperação obtidos neste estudo são superiores aos encontrados por Gathumbi et al. (2003), que também avaliaram a aplicação de imunoensaio enzimático na detecção de AFB₁ em fígado de frango. Os autores obtiveram taxas de recuperação variando de 52,6 a 65,5% para amostras contendo de 1,0 a 5,0 ng de AFB₁/g, a recuperação está em desacordo com o preconizado pela Comunidade Européia (CE n° 401/2006), enquanto que neste trabalho a recuperação média para 5,0 ng de AFB₁/g foi de 81,3%, a divergência nas taxas de recuperação deve-se provavelmente a diferenças no processo de extração entre os trabalhos.

A análise de precisão foi conduzida por repetibilidade e precisão intermediária (Tabela 6). A repetibilidade, que avalia a precisão intracorrida, apresentou coeficiente de variação abaixo do preconizado de 15% pela ANVISA (2003) para todas as concentrações testadas, com valores de 3,8%, 4,6% e 4,0% para as concentrações de 1,5 ng/g,

3,0 ng/g e 5,0 ng/g respectivamente, os coeficientes baixos indicam pouca variação na leitura dos resultados em uma mesma corrida, garantindo a repetibilidade do método. Da mesma forma, a precisão intermediária apresentou resultados satisfatórios de CV para as três concentrações testadas, com valores de 4,7%, 6,9% e 4,1% para as concentrações de 1,5 ng/g, 3,0 ng/g e 5,0 ng/g respectivamente, todos abaixo de 15%, preconizado pela legislação, garantindo a precisão do método para análise intercorrida, conduzida em dias diferentes.

Tabela 6 – Análise de precisão conduzida para determinação de AFB₁ em fígado de frango por ic-ELISA.

AFB ₁ (ng/g)	Repetibilidade ^a		Precisão Intermediária ^b		Valor de Referência ^c
	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
1,5	3,80		4,73		
3,0	4,62	4,13	6,90	5,24	15
5,0	3,97		4,09		

^a Resultados expressos em coeficiente de variação (CV) de uma repetição analisada em sete replicatas para cada concentração.

^b Resultados expressos em coeficiente de variação (CV) de três repetições analisadas em sete replicatas para cada concentração em dias diferentes.

^c Segundo ANVISA, 2003.

A robustez foi avaliada pela precisão das análises sujeitas a pequenas alterações em três variáveis no ic-ELISA, a primeira variável testada foi a mudança de operador durante a realização de curvas padrão, o coeficiente de variação obtido para as cinco concentrações testadas em triplicata, em sete dias diferentes, variou de 4% a 8% nas concentrações de 0,05 e 5,0 ng/mL, respectivamente, indicando baixa variação com a troca de analistas. As demais variáveis foram testadas durante o ensaio de precisão para as três concentrações analisadas, foi alterado o tempo de sensibilização (18 e 24 h) de AFB₁-BSA na placa, e foi usado duas micropipetas de marcas diferentes para preparo das soluções de AcM anti-AFB₁ e anti-IgG-HRP, de acordo com os baixos valores de CV obtidos na repetibilidade e precisão intermediária já descritos anteriormente, é possível afirmar que o método é robusto para as três variáveis testadas.

O limite de detecção calculado para este método foi de 1,2 ng AFB₁/g de fígado, resultado similar ao encontrado por Gathumbi et al. (2003), equivalente a 1,0 ng/g de AFB₁, e próximo aos kits comerciais tradicionais, com valores de 0,6 ng/g (marca A) e 2 ng/g

(marca B). O limite de quantificação calculado foi de 1,8 ng AFB₁/g de fígado, porém, segundo o INMETRO (2007), na análise em nível de traços recomenda-se adotar LQ como a menor concentração da curva padrão (neste estudo igual a 0,05 ng/ml, equivalente a 1,5 ng/g de fígado) e este, após determinado, deve ser testado quanto à precisão e exatidão. Assim optou-se por testar o LQ de 1,5 ng AFB₁/g de fígado, e conforme resultados já apresentados anteriormente, verificou-se que os parâmetros exigidos pela legislação foram satisfatórios, confirmando-se o LQ = 1,5 ng/g.

4. CONCLUSÃO

A produção nacional de imunorreagentes e o desenvolvimento e padronização de métodos imunológicos é um realidade promissora e necessária, em especial para reduzir a dependência por kits importados. O AcM anti-AFB₁ produzido neste estudo, a partir do hibridoma AF4, demonstrou alta especificidade, atingindo título de diluição equivalente à 1:10.000 na utilização por ic-ELISA, esse parâmetro, aliado aos demais avaliados neste estudo, permitiu o desenvolvimento de imunoensaio com custo cerca de 160 vezes inferior aos kits comerciais. O ic-ELISA desenvolvido se mostrou promissor na aplicação para triagem de AFB₁ em fígado de frango, com as vantagens de apresentar sensibilidade, especificidade, limites de detecção e quantificação condizentes com os níveis de contaminação naturalmente encontrados, além de permitir o uso de baixa quantidade de solvente e ser um método de fácil execução.

CAPÍTULO II

Aflatoxina B₁: imunofluorescência *in situ* e toxicidade em embrião de frango

Aflatoxina B₁: imunofluorescência *in situ* e toxicidade em embrião de frango. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Elisa Yoko Hirooka.

RESUMO

O Brasil é líder mundial em exportação de carne de frango e o segundo maior produtor, a garantia da saúde e produção animal é essencial na manutenção de posição destaque perante economia nacional e mundial. Compostos tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, as aflatoxinas (AF), são ameaça por contaminar as rações e causar efeitos tóxicos e carcinogênicos em aves. Imunofluorescência, técnica de base imunológica, é promissora na detecção de aflatoxicoses por permitir visualização mais clara e definida de lesões microscópicas no tecido, em associação com a detecção do agente causador (AF). Anticorpo monoclonal (AcM) antiaflatoxina foi produzido *in vitro*, através do cultivo de hibridoma linhagem AF4 em meio RPMI + 50% de soro fetal bovino (SFB), seguido de adaptação gradual ao meio H-SFM, resultando no total de 508,6 mg de anticorpo purificado. O AcM, ao título de 1:100, foi aplicado na detecção direta de AFB₁ em tecido hepático de embrião de frango por imuno-histoquímica colorimétrica (DAB-diaminobenzidina) e imunofluorescência (FICT-*Fluorescein Isothiocyanate*). Análise macroscópica, histológica e imuno-histoquímica foram conduzidas em quatro grupos experimentais com sete ovos embrionados cada, denominados G1: sem tratamento; G2: controle negativo da solução veículo (50% DMSO: 50% H₂O); G3: 50 ng AFB₁/ovo e G4: 1 µg AFB₁/ovo, injetados via saco de gema. Após 24 h de exposição, os embriões foram eutanaziados para análise, a taxa de sobrevivência foi de 85,7%; 42,9%; 28,6% e 0% para os grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente. Não houve diferença significativa no tamanho dos órgãos entre os grupos ($p > 0,05$). As lesões macroscópicas evidentes nos grupos tratados com AFB₁ foram hemorragia no coração (42,9% no G4; 28,6% no G3; 14,3% no G2 e sem observações no G1) e hemorragia no pulmão (57,1% no G4; 42,9% no G3 e sem observações no G2 e G1). Fígado e rins hemorrágicos foram evidenciados com maior frequência nos grupos tratados e controle (71,4% no G4 e G3; 42,9% no G2 e 14,3% no G1, para fígado; 57,1% no G4, G3 e G2 e 14,3% no G1, para rim), visto que o veículo dimetilsulfóxido (DMSO) também apresentou toxidez contra os embriões. Órgãos friáveis, que caracterizam os primeiros sinais de aflatoxicose, foram evidenciados no G4 (57,1%) e G3 (42,8%), mas não nos grupos controle. Na análise histológica, não houve diferença significativa no escore lesional total hepático entre os grupos G2, G3 e G4 (escore de 13,9; 14,1 e 16,3, respectivamente; $p > 0,05$), mas houve diferença dos três grupos em relação ao G1 (escore de 3,1; $p < 0,05$). A presença de dissociação dos hepatócitos, necrose e inflamação aleatória foram expressivas nos grupos tratados com AFB₁ e DMSO, não sendo detectadas G1. Na imuno-histoquímica, ambas as técnicas colorimétrica e fluorescente foram capazes de detectar AFB₁ no tecido, sendo que a imunofluorescência permitiu a visualização definida da marcação da toxina nos hepatócitos, se comparada à colorimétrica, que marcou toda a extensão dos hepatócitos com deposição do DAB. A imunofluorescência se mostrou promissora no diagnóstico de aflatoxicose em frango.

Palavras-chave: anticorpo monoclonal, imuno-histoquímica, aflatoxicose

Aflatoxin B₁: immunofluorescence *in situ* and toxicity in chicken embryo. 2016. Dissertation (Masters in Food Science) - Department of Food Technology, State University of Londrina, Londrina. Advisor Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka.

ABSTRACT

Brazil is the world's leading exporter of chicken meat and second main producer, ensuring animal health and production is essential to maintain this leading position in national and world economy. Toxic compounds produced by fungi of the genus *Aspergillus*, the aflatoxins (AF), are threat in order to contaminate feed and cause toxic and carcinogenic effects in poultry. Immunofluorescence, an immunological based technique, is promising for detection of aflatoxicosis to allow clearer and distinct visualization of microscopic lesion in the tissue, in association with the detection of the causative agent (AF). Monoclonal antibody (mAb) anti-aflatoxin was produced *in vitro*, by the cultivation of hybridoma lineage AF4 in RPMI medium + 50% fetal bovine serum (FBS), followed by gradual adaptation to the H-SFM medium, resulting in a total of 508.6 mg of purified antibody. Mab was applied for direct detection of AFB₁ in liver tissue of chicken embryo, at a titer of 1: 100, by colorimetric immunohistochemistry (DAB-diaminobenzidine) and immunofluorescence (FITC-Fluorescein Isothiocyanate). Macroscopic, histological and immunohistochemical analysis were conducted in four groups with seven embryonated eggs each, defined as: G1: no treatment; G2: negative control of vehicle solution (50% DMSO: 50% H₂O); G3: 50 ng AFB₁/egg and G4: 1 µg AFB₁/egg, injected via yolk sac. After 24 hours of exposure, the embryos were sacrificed for analysis, the survival rate was 85.7%; 42.9%; 28.6% and 0% for the groups G1, G2, G3 and G4, respectively. There was no significant difference in the size of organs between the groups ($p > 0.05$). The evident macroscopic lesions in the groups treated with AFB₁ were heart hemorrhage (42.9% in G4, 28.6% in G3, 14.3% in group 2 and no observations in G1) and lung hemorrhage (57.1% in G4, 42.9% in G3 and no observations in G2 and G1). Hemorrhage in liver and kidney were evidenced more frequently in treated and control groups (71.4% in G4 and G3, 42.9% in G2 and 14.3% in G1, for liver; 57.1% in G4, G3 and G2 and 14.3% in G1, for kidney), since dimethylsulfoxide (DMSO), used as a vehicle solution, also showed toxicity against embryos. Friable organs, that characterize one of the first aflatoxicosis signals, were observed in G4 (57.1%) and G3 (42.8%), and not observed in control groups. At the histological analysis, there was no significant difference in total lesion score of the liver between G2, G3 and G4 (score of 13.9, 14.1 and 16.3, respectively; $p > 0.05$), but there was difference of the three groups compared to G1 (score 3.1; $p < 0.05$). The presence of dissociation of hepatocytes, necrosis and inflammation areas were expressive in the groups treated with AFB₁ and DMSO, not being detected in G1. The analysis by immunohistochemistry, both colorimetric and fluorescent techniques were able to detect AFB₁ in tissue, immunofluorescence allowed defined visualization of the toxin in hepatocytes, compared to colorimetric, that has marked the whole extension of hepatocytes by deposition of DAB. Immunofluorescence has been promising for diagnosis of aflatoxicosis in chicken.

Key words: monoclonal antibody, immunohistochemistry, aflatoxicosis

1 INTRODUÇÃO

Aflatoxina representa um grupo de micotoxinas amplamente estudado devido aos seus efeitos comprovadamente tóxicos e carcinogênicos, são produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, sobretudo por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*. Os principais análogos são B₁, B₂, G₁ e G₂, seus efeitos tóxicos estão relacionados, sobretudo, à hepatotoxicidade e hepatocarcinogênese, sendo a aflatoxina B₁ classificada no Grupo I – carcinogênica para o homem, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2002).

AF contaminam alimentos de consumo humano e animal, sobretudo os cereais, que estão susceptíveis ao crescimento de fungos toxigênicos, tanto na etapa de produção a campo, quanto durante o armazenamento dos grãos (OKOLI et al., 2007). O Brasil se consolidou como principal exportador de carne de frango no mundo, e atingiu a marca de segundo maior produtor dessa carne em 2016 (ABPA, 2015 e ABPA, 2016). Portanto, a detecção precoce de aflatoxicose em animais é importante na implementação de medidas rápidas e efetivas para seu controle, evitando perdas na produção e garantindo a saúde animal.

As aves apresentam efeitos tóxicos das AFs em concentrações abaixo de 15-30 µg/kg de peso corporal, a via de metabolização da aflatoxina em aves é similar a que ocorre em humanos, resultando nos mesmos metabólitos e AFB₁-8,9-*exo*-epóxido a partir da AFB₁, que pode se ligar ao DNA, proteínas e outros nucleófilos, acarretando em mutações e efeitos carcinogênicos. A diferença ocorre na falta de eficiência no sistema de detoxificação mediado pela glutathione S-transferase (GST) em aves, com baixa afinidade do epóxido-AFB₁ pelas GSTs, sendo essa a provável razão de aves serem extremamente sensíveis à AFB₁ (KLEIN, 2000 *apud* RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

Os efeitos tóxicos das AFs em frango são mais relevantes na fase inicial de criação, porém o efeito negativo no ganho de peso persiste até a fase final (HUFF, 1986 *apud* TESSARI; CARDOSO, 2012). Na intoxicação aguda os principais efeitos observados são perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragia e morte. A primeira mudança é aumento de órgãos internos como fígado, baço e rins, enquanto a “bursa de Fabricius” e o timo diminuem (OSWEILER, 1990 *apud* TESSARI; CARDOSO, 2012). Na síndrome crônica, o sinal mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais (LEESON, 1995 *apud* TESSARI; CARDOSO, 2012).

O desenvolvimento de técnicas sensíveis, que permitam a detecção de AF e a visualização dos seus efeitos tóxicos no tecido animal, é importante no diagnóstico efetivo

de aflatoxicoses. A imuno-histoquímica permite esse diagnóstico, por associar a detecção do agente tóxico ou etiológico de uma doença, com a visualização de lesões microscópicas compatíveis com a presença do agente no organismo, sendo promissora no diagnóstico de intoxicações, infecções e na detecção de neoplasias em sua fase inicial. (ROCHA et al., 2004 e GUEDES, 2010).

A imunofluorescência é uma técnica analítica promissora, os marcadores fluorescentes tornaram-se escolha de utilização em técnicas de imuno-histoquímica, por terem se desenvolvido rapidamente nos últimos 15 anos e apresentarem as vantagens de alta sensibilidade observadas em enzimas e compostos radioativos, mas sem os perigos radioativos associados (LI; ZHANG; ZHANG, 2009).

A técnica de imunofluorescência permite a detecção e visualização mais clara e definida de estruturas celulares como núcleo, citoplasma e organelas, possibilitando a coloração de cada estrutura em uma cor diferente, o que facilita a diferenciação e permite a identificação de alterações nessas estruturas, sendo promissora no diagnóstico de aflatoxicoses em tecidos animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Um total de 28 ovos embrionados SPF (livres de patógenos específicos) de galinhas (*Gallus gallus domesticus*), provenientes da Empresa VALO BioMedia do Brasil, Uberlândia – MG, foram utilizados nos testes.

O hibridoma linhagem AF4 secretor de AcM específico para AFB₁ (isotipo IgG₁ lambda), derivado de mieloma linhagem SP2/0-AG14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, foi gerado por Kawamura *et al.* (1988) em *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo* e, mantidas em *Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University*, Japão.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais, da Universidade Estadual de Londrina, em 18 de dezembro de 2014, conforme registro sob o processo CEUA n° 24700.2014.99 (Anexo A).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Produção de AcM específico para aflatoxina

O cultivo do hibridoma foi iniciado em meio RPMI (Gibco Co., USA) com 50% de soro fetal bovino (Gibco Co., USA), 2 mM de glutamina, 23 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES e 1 ml de gamicina (40 mg/mL), para estimular a recuperação do hibridoma congelado. A viabilidade celular foi avaliada microscopicamente com corante vital Azul de Trypan. O cultivo ocorreu em microplaca de 24 orifícios a 37° C com 5% CO₂. Procedeu-se a diminuição gradativa de SFB até 10% no meio RPMI seguido da adaptação em meio *Hybridoma-SFM* (*serum free medium* H-SFM, Gibco Co., USA), adicionando gradualmente 25, 50, 75 e 100% de H-SFM suplementado com 2 mM de glutamina, 5000 U/mL de penicilina e 5000 µg/mL de estreptomicina (HEUSSNER, 2007; KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*). A produção de AcM foi realizada em cultivo estático no meio H-SFM, efetuando a expansão celular para frascos de cultivo de 25, 75 e 150 cm², até a quantidade requerida. O sobrenadante de cultivo contendo o AcM foi filtrado para remover o material celular, precipitado com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ (243g/L) sob agitação lenta a 4° C por 16 h, posteriormente foi filtrado e o precipitado proteico foi dissolvido em menor quantidade possível de PBS e dialisado (*cut-off* de 12000-16000 MM, tamanho 25 mm x 16 mm) empregando-se PBS (4 x 1 L) a 4° C por 16 h. O AcM produzido foi avaliado quanto à concentração protéica a 280 nm (HARLOW & LANE, 1988c), grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970) e atividade anti-AFB₁ por i-ELISA (Kawamura *et al.*, 1988).

2.2.2 Delineamento Experimental

Quatro grupos experimentais foram conduzidos com sete ovos embrionados cada, designados da seguinte forma: G1: sem tratamento; G2: controle negativo da solução veículo, com inoculação somente da solução veículo 50% DMSO (Sigma-Aldrich Co., USA) : 50% água esterilizada; G3: inoculação de 50 ng AFB₁/ovo e G4: inoculação de 1 µg AFB₁/ovo.

Os padrões de AFB₁ (Sigma-Aldrich Co., USA) foram previamente quantificados em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S22, UK), empregando comprimento de onda de 360 nm e coeficiente de absorvidade molar de 21.800 M⁻¹ L⁻¹ cm⁻¹ (IAL, 2008), em seguida foram secos em banho a 40°C sob fluxo de nitrogênio e ressuspensos em mistura estéril de DMSO: água (50:50, v/v), as respectivas doses de AFB₁ foram ajustadas para inoculação de volume de 200 µl/ovo.

Os ovos foram incubados a 37°C em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) com controle de umidade, foi realizada rolagem dos ovos quatro vezes ao dia e ovoscopia diária para verificar a viabilidade dos embriões. As soluções controle e contendo AFB₁ foram injetadas no 18° dia de incubação via saco de gema, seguindo metodologia descrita por Brunnemann et al. (2002), onde os ovos foram esterilizados com álcool 70%, a casca perfurada a 0,5 cm da parte pontiaguda com agulha hipodérmica e o local de injeção foi selado com parafina. Os embriões permaneceram em contato com a toxina por 24 horas, e os ovos foram eclodidos para análise no 19° dia de incubação. Os embriões foram eutanaziados e examinados quanto ao desenvolvimento de lesões macroscópicas; os órgãos foram pesados, fixados em formaldeído e processados seguindo dois protocolos: Protocolo A - segundo Azambuja (2004) e Protocolo B - segundo o Manual de Técnicas Histológicas da Fiocruz (CAPUTO, GITIRANA, MANSO, 2014), ambos descritos no Apêndice. Os fígados dos animais foram analisados por histologia e imuno-histoquímica.

2.2.3 Histologia

Os fígados dos embriões, processados pelo Protocolo B, foram submetidos a cortes semi-seriados de 5 µm em MicrótoMO Leica RM2265, em seguida, as lâminas resultantes foram desparafinizadas e coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE) de acordo com o PROTOCOLO C – HISTOLOGIA, descrito no Apêndice.

A intensidade das lesões foi classificada em escores de 0 a 3: (0) ausência de alterações; (1) alteração discreta (menos de 25% do corte); (2) alteração moderada (de 25 a 50% do corte) e (3) alteração intensa (mais de 50% do corte), para cada alteração histológica foi considerado um peso diferente de acordo com o impacto que exerce sobre a manutenção da função do órgão: (1) baixo impacto; (2) médio impacto e (3) alto impacto. O escore total (Tabela 1) foi calculado multiplicando-se o escore obtido na intensidade da lesão (0 - 3) com o peso do impacto da lesão no tecido (1-3).

Tabela 1 – Estabelecimento de escore para avaliar lesão histológica em fígado.

Tipo de Lesão	Fator de Severidade	Intensidade da Lesão	Escore Máximo Individual	Escore Máximo Total
Degeneração Vacuolar	1	0 – 3	3	
Inflamação Centrolobular	2	0 – 3	6	
Inflamação Periportal	2	0 – 3	6	
Inflamação Aleatória	2	0 – 3	6	
Hiperplasia Ductal	1	0 – 3	3	
Hipertrofia Ductal	1	0 – 3	3	60
Necrose	3	0 – 3	9	
Hemorragia	2	0 – 3	6	
Congestão	1	0 – 3	3	
Fibrose	2	0 – 3	6	
Dissociação	3	0 – 3	9	

2.2.4 Imuno-histoquímica

Os fígados dos embriões, processados pelo Protocolo A, foram submetidos a cortes semi-seriados de 5 µm em Micrótomo Leica RM2265, em seguida, as lâminas resultantes foram processadas de acordo com o PROTOCOLO D – IMUNO-HISTOQUIMICA, descrito no Apêndice.

A padronização da técnica imuno-histoquímica foi conduzida pela análise de três variáveis: concentração de anticorpo primário, concentração de anticorpo secundário e a técnica de visualização da reação, almejando a minimização da presença de artefatos e de ligações inespecíficas.

Foram testadas três concentrações de anticorpo primário (1:100; 1:1000; 1:10000) e três concentrações de anticorpo secundário (1:50; 1:500; 1:5000). Duas técnicas de visualização da reação foram avaliadas, através do uso de anticorpos secundários ligados a diferentes marcadores: na reação por colorimetria foi empregado o anticorpo secundário biotinilado, seguido de incubação com o complexo avidina-peroxidase e visualização da reação com a adição do reagente diaminobenzina (DAB); na reação por fluorescência foi utilizado o anticorpo secundário ligado ao marcador fluorescente fluoresceína isotiocianato (FICT), seguido da análise por imagem através do Programa MOTIC IMAGES ADVANCED 3.2.

A escolha das variáveis foi feita pela classificação das lâminas em marcação forte ou fraca, homogênea ou heterogênea, presença de artefatos e background; a definição da positividade da reação foi realizada pela comparação do corte do tecido com o controle

negativo (corte do mesmo tecido, na mesma lâmina, onde não foi colocado o anticorpo primário).

2.2.5 Análise Estatística

Os dados de escore total dos quatro grupos experimentais foram transformados em raiz quadrada, para atender aos pré-requisitos de distribuição normal e homogeneidade de variância, e então submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey, considerando-se nível de significância de 5%, através do software Statistica v.10 (StatSoft[®], USA).

Os dados de escore individual não atenderam aos pré-requisitos para o teste de análise de variância (ANOVA), e foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se nível de significância de 5%, através do software Statistica v.10 (StatSoft[®], USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE ACM ANTI-AFB₁ ATRAVÉS DE CULTIVO DE HIBRIDOMA AF4

Os resultados referentes à produção de AcM anti-AFB₁ estão descritos no item 3.1 do Capítulo I.

3.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A taxa de sobrevivência dos embriões foi de 85,7%; 42,9%; 28,6% e 0% respectivamente nos grupos sem tratamento, tratado com solução veículo, tratado com 50 ng AFB₁/ovo e tratado com 1,0 µg AFB₁/ovo. A DL₅₀ estimada para esse estudo está abaixo de 50 ng AFB₁/ovo, o que difere da DL₅₀ = 6,2 µg AFB₁/ovo encontrada por Williams, Deschl e Williams (2011), que utilizaram a mesma solução veículo (100 µL DMSO:100 µL H₂O) para solubilização da toxina que a usada neste trabalho, deixando a toxina exposta por quatro dias nos embriões. Edrington, Harvey e Kubena (1995) verificaram em seu estudo 48% e 68% de sobrevivência na administração de 50 ng e 25 ng AFB₁/ovo respectivamente, variações na mortalidade e no valor da DL₅₀ podem ocorrer devido às diferenças na sensibilidade dos embriões entre linhagens diferentes, idade do embrião, via de administração e volume de

solvente injetado (EDRINGTON; HARVEY; KUBENA, 1995 e WILLIAMS; DESCHL; WILLIAMS, 2011). Verificou-se também, que a injeção de 100 μ L de DMSO isoladamente no grupo controle G2 causou a morte de mais de 50% dos animais, demonstrando a toxicidade associada a esse composto nos embriões (WYATT & HOWARTH, 1976).

Os grupos tratados com aflatoxina B₁ apresentaram alterações macroscópicas nos órgãos indicativas da contaminação pela toxina, sendo as mais frequentes em relação aos grupos controle a presença de hemorragia no coração e pulmão (Figura 1), demonstrando que AFB₁ após metabolização chega à corrente sanguínea ligada à proteína albumina principalmente, e atinge órgãos sem função na detoxificação (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

Figura 1 – Alterações Macroscópicas observadas nos grupos controle e tratados com AFB₁.

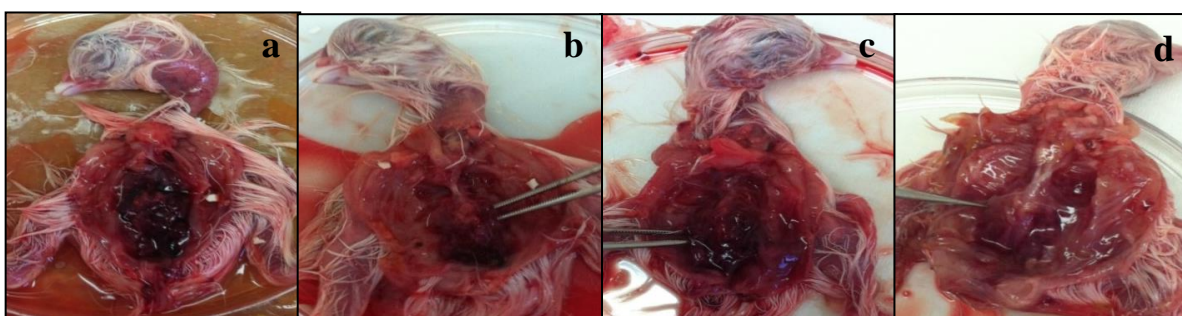
Alteração	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Fígado Hemorrágico	14,3%	42,9%	71,4%	71,4%
Rim Hemorrágico	14,3%	57,1%	57,1%	57,1%
Coração Hemorrágico	0%	14,3%	28,6%	42,9%
Pulmão Hemorrágico	0%	0%	42,9%	57,1%

G1: sem tratamento; G2: tratado com solução veículo (100 μ L DMSO:100 μ L H₂O); G3: tratados com 50ng de AFB₁/ovo; G4: tratado com 1 μ g de AFB₁/ovo.

Resultados expressos em porcentagem, n = 7.

Hemorragias no fígado e rim foram evidentes tanto nos grupos tratados com AFB₁ como DMSO, o que é esperado por serem órgãos que estão diretamente ligados à detoxificação e eliminação de compostos tóxicos, no tratamento com 1 μ g de AFB₁ a hemorragia foi ligeiramente mais intensa que nos demais grupos (Figura 2).

Figura 2 – Hemorragia observada nos embriões. (a) Tratamento com 1 μ g AFB₁/ovo. (b) Tratamento com 50 ng AFB₁/ovo. (c) Tratamento com DMSO:H₂O. (d) Sem tratamento.



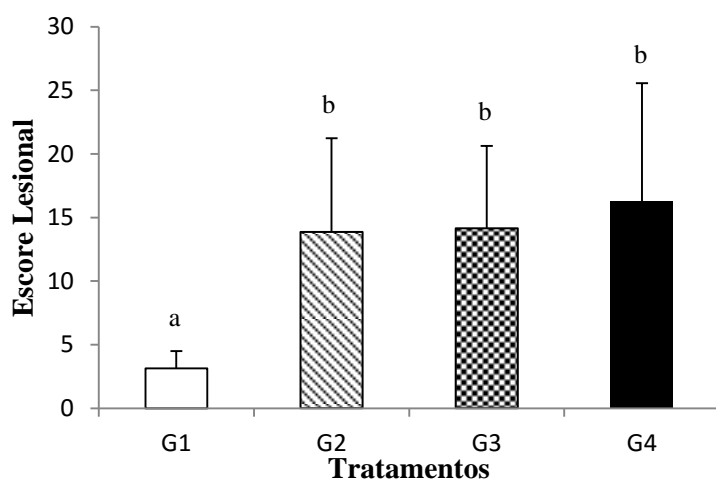
As alterações observadas no G2 devem-se, sobretudo, à administração de dimetilsulfóxido como controle da solução veículo, já que foi evidenciado por Wyatt e Howarth (1976) efeito tóxico dessa substância em embriões de frango, na concentração injetada nos ovos, tais como ação hemolítica e proliferação do sistema circulatório associado ao saco vitelínico e alantoide, causando alteração na integridade funcional do sistema vascular e comprometimento no desenvolvimento do embrião.

Não foi observada diferença significativa no tamanho dos órgãos entre os grupos ($p > 0,05$). A presença de órgãos friáveis, que caracterizam os efeitos primários da aflatoxicose (VILAR; OLIVEIRA; STAMFORD, 2002), foi evidenciada em 42,8% dos animais tratados com 50 ng AFB₁/ovo e em 57,1% no grupo tratado com 1µg AFB₁/ovo, não sendo detectada nos grupos controle.

3.3 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

O escore médio total obtido para lesões hepáticas está representado na Figura 3, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com AFB₁ e dimetilsulfóxido ($p > 0,05$), mas houve diferença em relação ao grupo sem tratamento ($p < 0,05$). O escore encontrado foi de $3,1 \pm 1,35$ para o grupo sem tratamento; $13,9 \pm 7,38$ para o tratado com 100 µL de DMSO; $14,1 \pm 6,49$ para o tratado com 50 ng de AFB₁ e $16,3 \pm 9,27$ para o tratado com 1,0 µg de AFB₁.

Figura 3 – Escore lesional hepático total causado por AFB₁ e DMSO em embrião de frango.



G1: sem tratamento; G2: tratado com solução veículo (100 µL DMSO:100 µL H₂O);

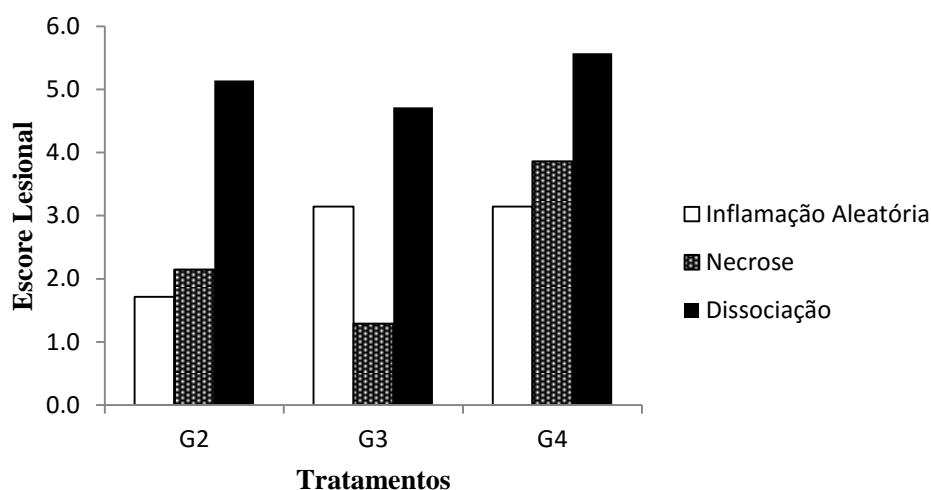
G3: tratado com 50ng de AFB₁/ovo; G4: tratado com 1µg de AFB₁/ovo.

Valores expressos em média ± DP, n= 7.

^{a-b} Diferença significativa ($p < 0,05$, one-way-ANOVA).

Considerando o escore obtido por cada lesão individualmente, a presença de dissociação dos hepatócitos, necrose e inflamação aleatória (Figura 5, b e d) foram as mais expressivas nos grupos tratados com AFB₁ e DMSO, não sendo detectadas no grupo sem tratamento, estas lesões são responsáveis por exercer médio ou alto impacto sobre a função do órgão. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com AFB₁ e grupos controle na análise individual das lesões ($p > 0,05$), embora seja possível observar na Figura 4, que o grupo tratado com 1 µg AFB₁/ovo apresentou escore mais exarcebado na necrose, com valores de 2,1; 1,3 e 3,9 para G2, G3 e G4, respectivamente; na inflamação aleatória foi obtido o mesmo escore para o grupo tratado com 50 ng e 1 µg AFB₁, com valores de 1,7; 3,1 e 3,1 para G2, G3 e G4, respectivamente; e na dissociação dos hepatócitos os escores foram de 5,1; 4,7 e 5,6 para os grupos G2, G3 e G4, respectivamente.

Figura 4 – Escore das principais lesões hepáticas causadas por AFB₁ e DMSO em embrião de frango.

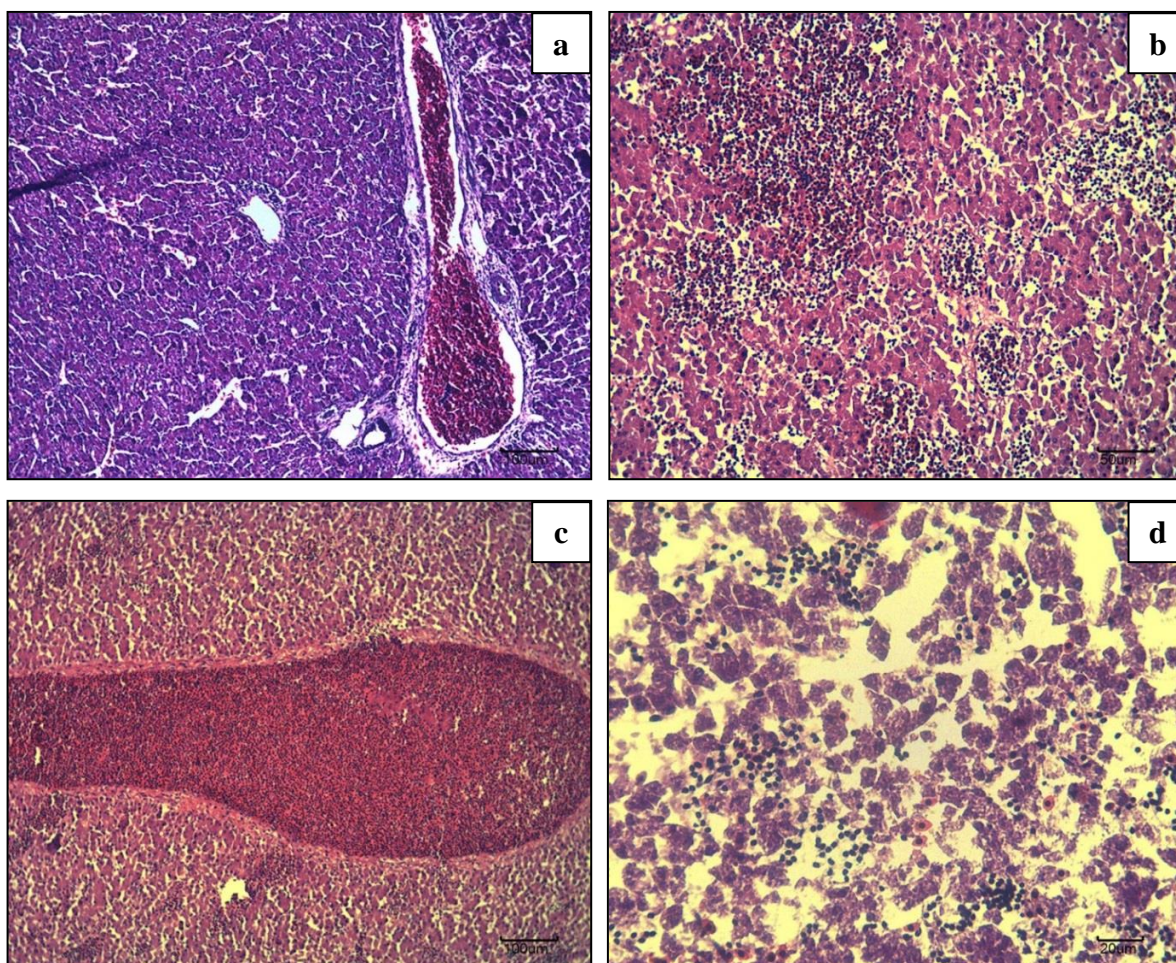


G1: sem tratamento; G2: tratado com solução veículo (100 µL DMSO:100 µL H₂O); G3: tratado com 50ng de AFB₁/ovo; G4: tratado com 1µg de AFB₁/ovo.
Valores expressos em média, n= 7.

Em menor frequência e intensidade foram também verificados pontos de fibrose, degeneração vacuolar e congestão (Figura 5, c) em todos os grupos, e inflamação centrolobular e periportal nos grupos G2, G3 e G4. O fígado é considerado órgão alvo para AFB₁, pois é neste órgão onde as aflatoxinas são bioativadas em 8,9-*exo*-epóxido, forma reativa que se liga à DNA e proteínas, causando danos à estrutura hepática. Embora os danos teciduais causados pela solução veículo (DMSO) nos hepatócitos foram também expressivos, foi possível observar neste trabalho lesões mais exarcebadas nos grupos tratados com AFB₁,

em especial com 1 μg AFB₁/ovo, como inflamação e necrose, lesões importantes que prejudicam a manutenção adequada do órgão, comprovando o efeito prejudicial das aflatoxicoses sobre as aves.

Figura 5 – Lesões hepáticas causadas por aflatoxina B₁ e DMSO em embrião de frango. (a) Espaço porta normal, HE, 10x; (b) Inflamação aleatória predominantemente linfocítica, HE, 20x; (c) Congestão e inflamação aleatória, HE, 10x, nos grupos tratados com 50 ng AFB₁/ovo e (d) Necrose e dissociação, HE, 40x, nos animais tratados com 1 μg de AFB₁/ovo.



As lesões histopatológicas encontradas neste trabalho são comparáveis com demais encontrados na literatura, Solcan et al. (2013) evidenciaram em hepatócitos de aves tratadas com 54 μg AFB₁/kg de peso corporal presença de degeneração vacuolar, congestão, proliferação de células epiteliais, áreas com necrose moderada e infiltração de células inflamatórias, da mesma forma, Denli et al. (2009) reportou dano hepático significativo em aves tratadas com 1 mg AFB₁/kg de ração, tendo observado áreas de degeneração vacuolar, inflamação perilobular, hiperplasia ductal e hipertrofia em comparação às aves sem contaminação na dieta.

3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Na padronização de imunofluorescência, o AcM anti-AFB₁ foi testado em três diferentes concentrações, a diluição que permitiu melhores marcações foi a 1:100, correspondente ao anticorpo na concentração de 5,6 µg/mL, esta concentração está adequada para imuno-histoquímica, onde recomenda-se uso a partir de 5,0 µg/mL (ABCAM, 2015). Avaliou-se também as diluições de 1:1.000 e 1:10.000, na tentativa de utilizar menor quantidade de reagente, porém as marcações no tecido foram menos expressivas do que quando usado AcM ao título de 1:100, em especial no grupo tratado com 50 ng AFB₁/ovo, assim optou-se pela menor diluição para garantir a sensibilidade da técnica.

O anticorpo secundário ligado à substância fluorescente FICT foi testado nas diluições de 1:50; 1:500 e 1:5000, buscou-se pela redução do background no tecido e pela minimização da presença de artefatos. Na diluição 1:50, foi observado regiões do tecido marcadas difusamente em praticamente a sua totalidade e verificou-se alto background, fatores que eliminaram essa diluição. Na comparação entre as diluições 1:500 e 1:5.000, ambas foram capazes de marcar o tecido com redução do background e de forma mais homogênea, porém a diluição 1:500 foi a de escolha por garantir melhor intensidade de fluorescência e facilitar na diferenciação dos tecidos marcados e não marcados, é importante ressaltar que a técnica de imuno-histoquímica constitui de avaliação subjetiva dos dados e dependente da interpretação de quem os analisa, por isso, a padronização deve ser feita pelo mesmo analista, ou grupo de analistas, a fim de que as definições não sejam afetadas por diferentes interpretações.

Na imuno-histoquímica colorimétrica, foi fixado a diluição do anticorpo primário em 1:100 e do anticorpo secundário biotilado em 1:4.000, conforme instruções do fabricante. Na comparação entre as marcações por colorimetria e fluorescência, a principal diferença foi na marcação de regiões do tecido na sua totalidade, quando realizada imuno-histoquímica colorimétrica (Figura 6), devido à deposição do substrato cromogênico DAB sob toda a extensão dos hepatócitos, já na imunofluorescência se observa pontos de fluorescência em regiões bem definidas nos hepatócitos (Figura 7), neste caso o composto fluorescente (FICT), que gera a intensidade do sinal, está diretamente ligado ao anticorpo secundário, não ocorre a deposição do corante sobre a célula e a marcação em toda a extensão, como observado na reação colorimétrica.

Figura 6 – Detecção de AFB₁ em fígado de embrião de frango por imuno-histoquímica colorimétrica. (a) e (b) Tecido sem marcação no grupo controle tratado com DMSO:H₂O, 10x e 40x, respectivamente; (c) e (d) Tecido com marcação (seta) no grupo tratado com 50 ng AFB₁/ovo, 10x e 40x, respectivamente; (e) e (f) Tecido com marcação (seta) no grupo tratado com 1,0 µg AFB₁/ovo, 10x e 40x, respectivamente.

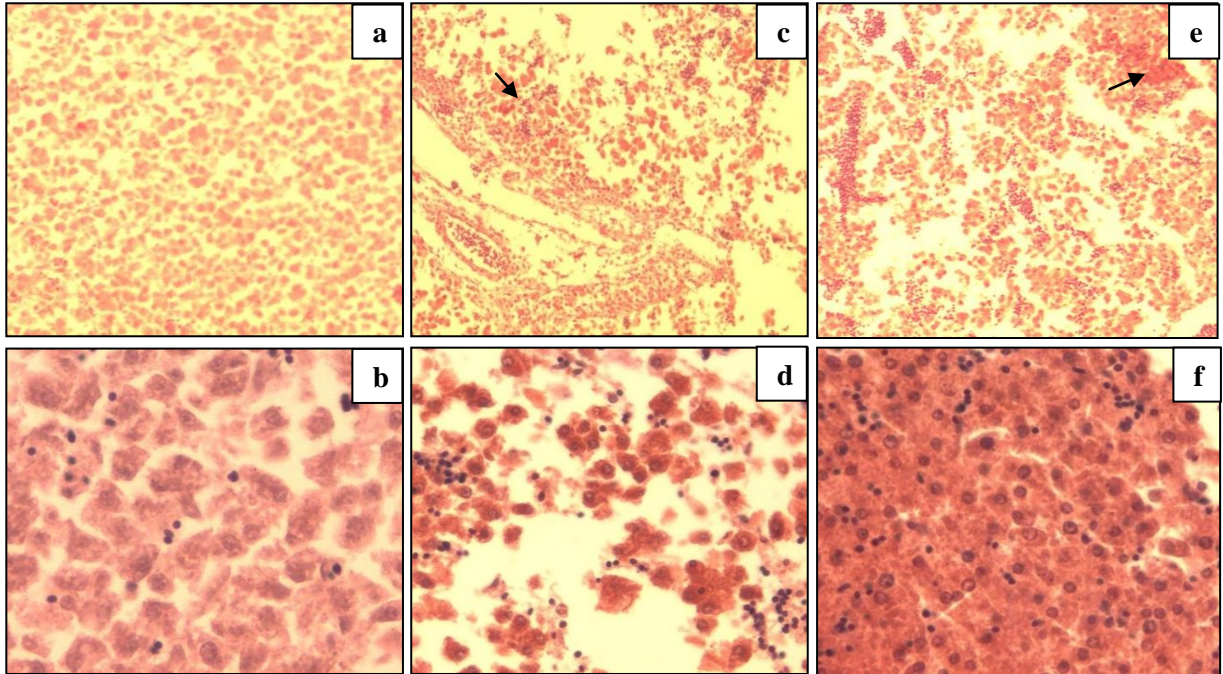
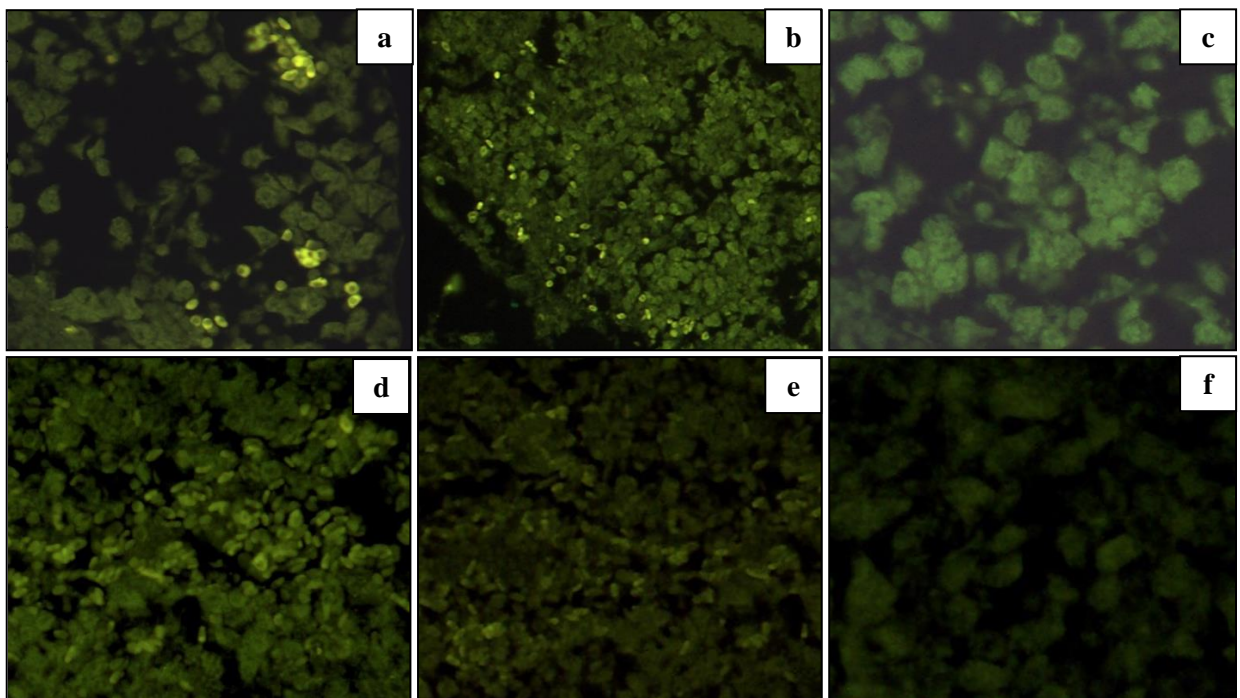


Figura 7 - Detecção de AFB₁ em fígado de embrião de frango por imunofluorescência. (a) e (b) Marcação positiva no grupo tratado com 1,0 µg AFB₁/ovo, 40x e 20x, respectivamente; (c) Controle negativo (sem anticorpo) do grupo tratado com 1,0 µg AFB₁/ovo, 40x; (d) e (e) Marcação positiva no grupo tratado com 50 ng AFB₁/ovo, 40x e 20x, respectivamente; (f) Controle negativo (sem anticorpo) do grupo tratado com 50 ng AFB₁/ovo, 40x.



Duas etapas da reação foram consideradas críticas para obtenção de bons resultados, sendo elas a recuperação antigênica e o bloqueio da lâmina. A etapa de bloqueio é realizada para reduzir as reações inespecíficas, que podem ocorrer entre o anticorpo e componentes teciduais carregados eletricamente ou com receptores de imunoglobulinas teciduais (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2014). Na reação, as lâminas foram testadas em solução bloqueio (PBST+BSA 2%) por 30 min e 1 hora, verificou-se que nas lâminas deixadas por 30 min em solução, havia marcações nos grupos sem tratamento e tratados com solução veículo que poderiam sugerir a presença de aflatoxina, levando a resultados falso-positivos, esse problema foi minimizado nas lâminas deixadas por uma hora em solução.

Teste de comparação foi realizado entre cortes de tecido submetidos ou não à recuperação antigênica, necessária em alguns casos para reexpor os epítomos do antígeno, que podem estar encobertos por uma rede formada por ligações cruzadas entre o fixador aldeídico (formol) e proteínas teciduais (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2014). Observou-se nas lâminas sem recuperação antigênica, a ausência ou diminuição da fluorescência quando comparada à lâmina do mesmo corte submetida à recuperação, podendo levar a diagnósticos falso-negativos.

Ambas as técnicas foram satisfatórias na detecção de AFB₁ em tecido hepático de embrião de frango, a realização de controle negativo para cada lâmina analisada é imprescindível, principalmente na reação imunofluorescente onde o tecido de forma geral adquire fluorescência em menor intensidade (background), conforme verificado na Figura 7 (c) e (f).

Na imunofluorescência se observa diferença na intensidade de fluorescência entre os grupos tratados com 1 µg AFB₁/ovo (Figura 7 (a)) e 50 ng AFB₁/ovo (Figura 7 (d)), embora não seja possível estabelecer o nível de contaminação somente pela intensidade, o que torna a imuno-histoquímica um método de detecção, na imuno-histoquímica colorimétrica a diferença de coloração entre os grupos tratados com 50 ng e 1 µg AFB₁/ovo não é evidente (Figura 6 (d) e (f), respectivamente).

Mendoza, Rivas-Jimenez e Garcia (2011) estudaram a ligação de AFB₁ e *Lactobacillus reuteri* por imunofluorescência, com anticorpo primário marcado por FICT, verificaram pela técnica que a toxina se liga a superfície celular da bactéria, e é reconhecida pelo anticorpo que garante a emissão da fluorescência. Lee et al. (2004) investigaram por imunofluorescência a distribuição de enzimas envolvidas no processo biossintese de aflatoxina em *Aspergillus parasiticus* (Nor-1, Ver-1 e OmtA), os autores detectaram as

enzimas em todas as frações testadas, estando em maior quantidade na fração correspondente a 24-48 h de crescimento da colônia fúngica.

Santella et al. (1993) detectaram adutos de aflatoxina B₁ – DNA em tecido com tumor e tecido adjacente saudável de pacientes com carcinoma hepatocelular, e em ratos tratados com 2,5 mg/kg de AFB₁, por imunofluorescência com anticorpo secundário marcado por FICT. Os adutos foram detectados em 30% das amostras de hepatocarcinoma e 26% dos tecidos saudáveis, a marcação por FICT foi localizada no núcleo das células dos animais e dos pacientes avaliados.

4. CONCLUSÃO

O estudo da toxicidade de embriões de frango por AFB₁ revelou que mesmo baixa dose de toxina associada à DMSO causou a morte de mais da metade dos animais; hemorragias em órgãos vitais e lesões microscópicas que afetam a manutenção adequada do fígado foram os principais sinais de toxicidade causados pela micotoxina e dimetilsulfóxido nos embriões. O AcM produzido permitiu a detecção de AFB₁ em tecido hepático de frango por imuno-histoquímica colorimétrica e fluorescente, sendo que na imunofluorescência observou-se marcação de regiões bem definidas nos hepatócitos, enquanto que na colorimétrica houve deposição do substrato cromogênico sob toda a extensão dos hepatócitos. A técnica de imuno-histoquímica padronizada se mostrou promissora na detecção de aflatoxicose em aves, com a vantagem da produção ilimitada do reagente central (AcM) através do hibridoma AF4.

CONCLUSÃO GERAL

A toxicidade de AFB₁ em embrião de frango foi verificada mesmo na administração de baixa dose da toxina, embora o dimetilsulfóxido usado como solução veículo tenha apresentado ação tóxica significativa contra os embriões. AFB₁ contribuiu na intensidade de hemorragias em órgãos vitais e lesões microscópicas que afetam a manutenção adequada do fígado do embrião, comprometendo a saúde do animal.

O AcM anti-AFB₁ produzido neste estudo a partir do hibridoma AF4 demonstrou alta especificidade, a possibilidade de produção ilimitada desse imunorreagente torna viável o desenvolvimento de métodos imunológicos nacionais para detecção e triagem de micotoxinas.

ic-ELISA padronizado e validado intralaboratorialmente apresentou sensibilidade, especificidade e limites de detecção e quantificação condizentes com os níveis de contaminação naturalmente encontrados, além de garantir o uso de baixa quantidade de solvente e ser um método de fácil execução. O imunoenensaio se mostrou promissor na aplicação para triagem de AFB₁ em fígado de frango, com custo cerca de 160 vezes inferior aos kits comerciais.

O AcM produzido permitiu a detecção de AFB₁ em tecido hepático de frango por imuno-histoquímica colorimétrica e fluorescente, sendo que na imunofluorescência observou-se marcação de regiões bem definidas nos hepatócitos, enquanto que na colorimétrica houve deposição do substrato cromogênico sob toda a extensão dos hepatócitos. A técnica de imuno-histoquímica padronizada se mostrou promissora na detecção de aflatoxicose em aves.

REFERÊNCIAS

- ABCAM - **Antibody dilutions and titer**. 2015. Disponível em: <<http://www.abcam.com/protocols/antibody-dilutions-and-titer>>. Acesso em: 10/09/2015.
- ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015**. 2016. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>>. Acesso em: 19 mar 2016. (a).
- ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Exportações de dezembro crescem 14,3% e registram segundo melhor desempenho da história**. 2016. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/carne-de-frango-exportacoes-de-dezembro-crescem-143-e-registram-segundo-melhor-desempenho-da-historia-1511>>. Acesso em: 19 mar 2016. (b).
- ALY, S.A., ANWER, W. Effect of naturally contaminated feed with aflatoxins on performance of laying hens and the carryover of aflatoxin B₁ residues in table eggs. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, n.2, p. 181 – 186, 2009.
- ANFOSSI, L.; DI NARDO, F.; GIOVANNOLI, C.; PASSINI, C.; BAGGIANI, C. Enzyme immunoassay for monitoring aflatoxins in eggs. **Food Control**, v. 57, p. 115 – 121, 2015.
- ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v.13, p. 173-183, 2002.
- ARAUJO, F.C. **Expressão e localização das proteínas c-Fos e receptor de estrogênio beta no testículo humano**. 46f. Tese (Mestre em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2006.
- AZAMBUJA, A.P. **Avaliação da distribuição da proteína STI1, um ligante da proteína príon celular, em embriões de camundongo**. 36f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2004.
- BASSO, K. **Efeitos das micotoxinas desoxinivalenol e fumonisina B1 sobre explantes intestinais de suínos**. 80f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR. 2013.
- BERTHILLER, F.;SULYOK, M.; KRSKA R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 33 – 37, 2007.
- BINDER, E.M.; TAN, L.M.; CHIN, L.J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.265–282, 2007.
- BRAICU, C.; RUGINA, D.; CHEDEA, V.S.; TUDORAN, O.; BALACESCU, O.; NEAGOE, I.; SOCACIU, C. Protective action of different natural flavan-3-ols against aflatoxin B₁-related cytotoxicity. **Journal of Food Biochemistry**, v.34, p.595-610, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os Limites Máximos Tolerados (LMT) de Micotoxinas em Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09 de novembro de 1988. Determina os padrões mínimos de matéria prima destinada à alimentação animal. **Diário Oficial da União** – Seção I, p. 21 – 968, Brasília, 1988.

BROSSI, C., CASTILLO, C.J.C., AMAZONAS, E.A., MENTEN, J.F.M. estresse térmico durante o pré-abate em frangos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1296-1305, 2009.

BRUNNEMANN, K.D., ENZMANN, H.G., PERRONE, C.E., IATROPOULOS, M.J., WILLIAMS, G.M. In ovo carcinogenicity assay (IOAC): evaluation of mannitol, caprolactam and nitrosoproline. **Arch Toxicology**, v. 76, p. 606 - 612, 2002.

CALLERI, E.; MARRUBINI, G.; BRUSOTTI, G.; MASSOLINI, G.; CACCIALANZA G. Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p.396–403, 2007.

CAPUTO, L.F.G., GITIRANA, L.B., MANSO, P.P.A. **Técnicas Histológicas**. Disponível em: <http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/img/capitulo_3_vol2.pdf>. Acesso em: 6 set. 2014.

CAST, 2003. Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plant, animals and human systems. CAST, Ames, USA, p. 139, 2003.

CHIOU, S.H., WU, S.W. Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. **Analytica Chimica Acta**, v. 383, p. 47 – 60, 1999.

COENTRÃO, P.A.M. Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo. 109f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ, 2005.

CONAB. Safra 2014/2015. **Revista Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília. ISSN: 2318-6852, v. 2, n.12, p. 1 - 134. 2015.

CONAB. Safra 2014/2015. **Revista Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília. ISSN: 2318-6852, v. 3, n.6, p. 1 - 140. 2016.

CORCUERA, L.A.; AMÉZQUETA, S.; ARBILLAGA, L.; VETTORAZZI, A.; TOURINO, S.; TORRES, J.L.; DE CERAIN, A.L. A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 989-995, 2012.

DENLI, M.; BLANDON, J.C.; GUYNOT, M. E.; SALADO, S.; PEREZ, J.F. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and

aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B₁. **Poultry Science**, v. 88, p. 1444-1451, 2009.

DOMENICO, A.S.D.; BUSSO, C.; HASHIMOTO, E.H.; FRATA, M.T.; CHRIST, D.; COELHO, S.R.M. Occurrence of *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., and aflatoxins in corn hybrids with different systems of storage. **Acta Scientiarum**, v.38, n.1, p. 111-121, 2016.

DORNER, J.W. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.2, p.203-208, 2008.

EDRINGTON, T.S.; HARVEY, R.B.; KUBENA. L.F. Toxic effects of Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A, alone and in combination, on chicken embryos. **Bull. Environ. Contam. Toxicology**, n. 54, p. 331 – 336, 1995.

EVEN, M. S.; SANDUSKY, C. B.; BARNARD, N. D. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.3, p.105-108, 2006.

FUJII, S.; GARCIA, L.B.; HIROOKA, E.Y. Metodologia analítica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. **Alimentos e Nutrição, Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 15, n.3, p.273-284, 2004.

GARCIA, D., BARROS, G., CHULZE, S., RAMOS, A.J., SANCHIS, V., MARIN, S. Impact of cycling temperatures on *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins production in soybean. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 92, p. 2952 – 2959, 2012.

GATHUMBI, J.K.; USLEBER, E.; NGATIA, T.A.; KANGETHE, E.K.; MARTLBAUERS, E. Application of immunoaffinity chromatography and enzyme immunoassay in rapid detection of aflatoxin B₁ in chicken liver tissues. **Poultry Science**, v.82, p. 585 – 590, 2003.

GOMES, G.A. **Nutrição pós-eclosão de frangos de corte**. 118f. Tese (Mestre em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP. 2007.

GUEDES, R.M.C. **Imuno-histoquímica: entendendo e utilizando a técnica no diagnóstico de enfermidades suínas**. V Forum Internacional de Suinocultura. Curitiba - Paraná, 2010. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/saude/artigos/imunohistoquimica-entendendo-utilizando-tecnica-t339/165-p0.htm>. Acesso em: 03 ago 2014.

HARLOW E., LANE D. Antibody molecules. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 7 - 22, 1988 (a).

HARLOW E., LANE D. Growing hybridomas. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 245-281, 1988 (b).

HARLOW E., LANE D. Protein Techniques. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 673, 1988 (c).

HEILMANN, K.; GROTH, TH.; BEHRING, O.; ALBRECHT, W.; SCHOSSIG, M.; LENDLEIN, A.; MICHEEL, B. The influence of the chemical composition of cell culture material on the growth and antibody production of hybridomas cells. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 291-301, 2005.

HEUSSNER, A.H.; MOELLER, I.; DAY, B.W.; DIETRICH, D.R.; O'BRIEN, E. Production and characterization of monoclonal antibodies against ochratoxin B. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45 p.827–833, 2007.

HOLFORD, T.R.J., DAVIS, F., HIGSON, S.P.J. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, p. 12 – 24, 2012.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Micotoxinas. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, 2008, p.759.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Stryrene. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, v. 82, p.171-300, 2002.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, v.56, p.489-521, 2002.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos**. Revisão 02, 2007.

JAENISCH, F.R.F., CARON, L., SCHIMIDT, G.S. **Doenças imunossupressoras**. Embrapa. 2014. Disponível em: <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000fy1j9mkm02wx5ok0pvo4k31iomdcv.html>. Acesso em: 11 ago 2014.

JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.1-10, 2000.

JULIÃO, A.M. **Avaliação da composição centesimal e aceitação sensorial da carne de frangos de linhagem comercial e tipo colonial comercializadas em nível varejista**. 105f. Tese (Mestre em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro – RJ. 2003.

KAWAMURA, O.; NAGAYAMA, S.; SATO, S.; OHTANI, K.; UENO, I.; UENO, Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B₁ in peanut products. **Mycotoxin Research**, v.4, p.75-87, 1988.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LEE, N.A.; WANG, S.; ALLAN, R.D.; KENNEDY, I.R. A rapid aflatoxin B₁ ELISA: Development and Validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2746-2755, 2004.

LEE, L.; CHIOU, C.; KLOMPARENS, K.L.; CARY, J.W.; LINZ, J.E. Subcellular localization of aflatoxin biosynthetic enzymes Nor-1, Ver-1, and OmtA in time-dependent fractionated colonies of *Aspergillus parasiticus*. **Arch. Microbiol.**, v. 181, p. 204-214, 2004.

LEGAZPI L., DÍAZ J., LACA A., DÍAZ M. Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: substrate and agitation effects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 122-130, 2005.

LI, P., ZHANG, Q., ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxins. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115-1126, 2009.

LI, T., BYUN, J.Y., KIM, B.B., SHIN, Y.B, KIM, M.G. Label-free homogeneous FRET immunoassay for detection of mycotoxins that utilizes quenching of the intrinsic fluorescence of antibodies. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 403 – 408, 2013.

LIMA, M.R., SILVA, V.P.A., FURTADO, R.F., ALVES, C.R., GUEDES, M.I.F., DUTRA, R.A.F. **Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio**. III Congresso Brasileiro de Mamona – Energia e Ricinoquímica, s.n, p. 1 – 4, Salvador, 2008.

LUCIOLLI, J. **Efeitos sistêmicos da contaminação por desoxinivalenol, fumonisina B e sua associação em suínos**. 179 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR. 2011.

MARCASSO, R.A. **Associação entre a presença de *Helicobacter ssp*, lesões hepáticas, proliferação celular e expressão de e-caderina no fígado de cães**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR. 2011.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Aves**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em: 05 ago 2014.

MARIN, S., RAMOS, A.J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.

MEDEIROS, L.G. **Características produtivas, qualidade de carne e enzimas digestivas de frangos de corte suplementados com selênio orgânico**. 67f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Universidade estadual de Londrina, Londrina – PR. 2012.

MENDOZA, A.H.; JIMENEZ, L.R.; GARCIA, H.S. Assessment of aflatoxin B₁ binding to *Lactobacillus reuteri* by microscopy and fluorescence techniques. **Food Biotechnology**, v.25, p. 140-150, 2011.

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

OFFICIAL JOURNAL OF EUROPEAN COMMUNITIES. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council, on undesirable substances in animal feed. May, 7th. 2002.

OFFICIAL JOURNAL OF EUROPEAN COMMUNITIES. EC 401/2006 – Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. February, 23th. 2006.

OFFICIAL JOURNAL OF EUROPEAN COMMUNITIES. EC 576/2006 - Commission Recommendation on the presence of desoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding, 17 de agosto de 2006.

OKOLI, I.C., OGBUEWU, P.I., UCHEGBU, M.C., OPARA, M.N., OKORIE, J.O., OMEDE, A.A., OKOLI, G.C., IBEKWE, V.I. Assessment of the Mycroflora of Poultry Feed Raw Materials in a Humid Tropical Enviroment. **The Journal of American Science**, v.3, n.1, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA, C.A.F., KOBASHIGAWA, E., REIS, T.A., MESTIERI, L.,ALBUQUERQUE, L., CORRÊA, BENEDITO. Aflatoxin B₁ residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. **Foos Additives and Contaminants**, v.17, n.6, p. 459 – 462, 2000.

OLIVEIRA, G.R., RIBEIRO, J.M., FRAGA, M.E., CAVAGLIERI, L.R., DIREITO, G.M., KELLER, K.M., DALCERO, A.M., ROSA, C.A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, p. 355 – 362, 2006.

ONO, E.Y.S., BERND, L.P., FUJII, S., RIBEIRO, R.M.R., HASHIMOTO, E. H., HIROOKA, E.Y. Princípios Básicos para Análise de Micotoxinas. **Editora da Universidade Estadual de Londrina**, Londrina- Pr, 2007.

PECUÁRIA RURAL. **Ubabef projeta alta para produção e exportação de carne de frango em 2014**. 2014. Disponível em: <http://pecuaria.ruralbr.com.br/noticia/2014/01/ubabef-projeta-alta-para-producao-e-exportacao-de-carne-de-frango-em-20144391589.html>. Acesso em: 05 ago 2014.

RACHED, E., HOFFMANN, D., BLUMBACH, K., WEBER, K., DEKANT, W., MALLY, A. Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to Ochratoxin A *in vivo* and *in vitro*. **Toxicological Science**, v. 103, n. 2, p. 371 - 381, 2008.

RAWAL, S., KIM, J.E., COULOMBE, R.A.J. Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.325-331, 2010.

RAWAL, S., COULOMBE, R.A.J. Metabolism of aflatoxin B₁ in Turkey liver microsomes: The relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, p. 349 – 354, 2011.

ROCHA, A.O., COUTINHO, L.M.B., LEBOUTE, L.D.A., SCHOLL, J.G. Expressão imuno-histoquímica e valor prognóstico da proteína p53 no carcinoma de vesícula biliar: estudo e 60 casos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n.6, p. 403 – 410, 2004.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia** 4^a ed.. Manole São Paulo. 1997.

RUI, B.R., ANGRIMANI, D.S.R., SILVA, M.A.A. Pontos críticos no manejo pré-abate de frango de corte: jejum, captura, carregamento, transporte e tempo de espera no abatedouro. **Ciência Rural**, v.41, n.7, p.1290-1296, 2011.

SANTELLA, R.M.; ZHANG, Y,J.; CHEN, C.J.; HSIEH, L.L.; LEE, C.S.; HAGHIGHI, B.; YANG, G.Y.; WANG, L.W.; FEITELSON, M. Immunohistochemical detection of aflatoxin

B₁-DNA adducts and hepatitis B virus antigens in hepatocellular carcinoma and nontumorous liver tissue. **Environmental Health Perspectives**, v. 99, p. 199-202, 1993.

SCHENZEL, J., FORRER, H.R., VOGELGSANG, S., HUNGERBUHLER, K., BUCHELI, T.D. Mycotoxins in the Environment: I. Production and Emission from an Agricultural test field. **Environmental Science & Technology**, n. 46, p. 13067 – 13075, 2012.

SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J. An Introduction to Spectroscopic Methods. In: SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 6. ed. Flórida: Saunders College Publishing, 1992. p. 508 – 535.

SOLCAN, C., GOGU, M., FLORISTEAN, V., OPRISAN, B., SOLCAN, G. The hepatoprotective effect of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries on induced aflatoxin B1 poisoning chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 966 - 974, 2013.

SOUZA, M.L.M., SULTYOK, M., SILVA, O.F., COSTA, S.S., BRABET, C., JUNIOR, M.M., SEKIYAMA, B.L., VARGAS, E.A., KRASKA, R., SCHUHMACHER, R. Cooccurrence of Mycotoxins in Maize and Poultry Feeds from Brazil by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **The Scientific World Journal**, v. 2013, article ID427369, 2013.

STROKA, J.; VAN OTTERDIJK, R.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. **Journal of Chromatography A**, v.904, p.251-256, 2000.

STUBBLEFIELD, R.D.; SHOTWELL, O.L. Determination of aflatoxins in animal tissues. **Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 64, n. 4, p. 964 – 968, 1931.

TESSARI, E.N.C., CARDOSO, A.L.S.P. Efeitos da aflatoxina sobre as aves: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano IX, n. 18, 2012.

TORRES, E.A.F.S., CAMPOS, C.N., DUARTE, M., GARBELOTTI, L.M., PHILIPPI, T.S., RODRIGUEZ, R.S.M. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 145 – 150. 2000.

TURNER, N.W., SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.632 n. 2, p. 168-180, 2009.

VALK, J., BRUNNER, D., SMET, K., SVENNINGSSEN, A.F., HONEGGER, P., KNUDSEN, L, E., LINDL, T., NORABERG, J., PRICE, A., SCARINO, M. L., GSTRALTHALER, G. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. **Toxicology in vitro**, n. 24, p. 1053 – 1063, 2010.

VILAR, E.A., OLIVEIRA, M.C.M., STAMFORD, T.L.M. Pesquisa micotoxicológica em fígado de aves produzidas e comercializadas em Pernambuco. **B.Ceppa**, v.20, n. 2, p. 335 – 346, 2002.

WILD, C.P., TURNER, P.C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**, v. 17, n. 6, p. 471 – 481, 2002.

WILLIAMS, J.G., DESCHL, U., WILLIAMS, G.M. DNA damage in fetal liver cells of turkey and chicken eggs dosed with aflatoxin B1. **Arch Toxicology**, v. 85, p. 1167 - 1172, 2011.

APÊNDICE

Descrição dos protocolos de histologia e imuno-histoquímica

PROTOCOLO A – FIXAÇÃO, PROCESSAMENTO E MICROTOMIA (AZAMBUJA, 2004, modificado)

1. Coletar e fragmentar os tecidos em placa de petri revestida com parafina
2. Fixar os tecidos em paraformaldeído tamponado 4% em PBS por 2 horas (volume 20x o das amostras, agitar constantemente)
5. Transferir o material para álcool 70% overnight
6. Substituir o álcool 70% por álcool 80%
8. Deixar em álcool 80% por 1 hora
7. Fazer duas trocas em álcool 90% (1 hora cada)
8. Fazer três trocas em álcool 100% (1 hora cada)
9. Lavar 2x em xilol (15 min cada)
10. Fazer duas trocas em parafina líquida a 56 - 60°C (30 min cada)
11. Emblocar em parafina
12. Microtomia

PROTOCOLO B – FIXAÇÃO, PROCESSAMENTO E MICROTOMIA (CAPUTO, GITIRANA, MANSO, 2014, modificado)

1. Coletar e fragmentar os tecidos em placa de petri revestida com parafina
2. Fixar os tecidos em paraformaldeído tamponado 10% em PBS por 24 horas (volume 20x o das amostras, agitar constantemente)
5. Transferir o material para álcool 70% overnight
6. Substituir o álcool 70% por álcool 80%
8. Deixar em álcool 80% por 1 hora
7. Fazer duas trocas em álcool 90% (1 hora cada)
8. Fazer três trocas em álcool 100% (1 hora cada)
9. Lavar 2x em xilol (15 min cada)
10. Fazer duas trocas em parafina líquida a 56 - 60°C (30 min cada)
11. Emblocar em parafina
12. Microtomia

PROTOCOLO C – HISTOLOGIA (CAPUTO, GITIRANA, MANSO, 2014, modificado)

a) *Hidratação dos cortes*

1. Deixar as lâminas com os cortes em estufa a 60°C por 2 horas
2. Fazer duas lavagens em xilol (10 min cada)
3. Fazer duas lavagens em álcool 100% (5 min cada)
4. Fazer uma lavagem em álcool 90% (5 min)
5. Fazer uma lavagem em álcool 70% (5 min)
6. Fazer uma lavagem em água destilada (5 min)
7. Banho em Hematoxilina de Harris (30 seg)
8. Banho em água corrente (5 min)
9. Banho em Eosina (1 min)
10. Banho em água destilada (passar rapidamente)

b) *Selagem das lâminas*

1. Fazer uma lavagem em álcool 70% (5 min)
2. Fazer uma lavagem em álcool 90% (5 min)
3. Fazer uma lavagem em álcool 100% (10 min)
4. Fazer uma lavagem em álcool: xilol (1:1, v/v) (30 min cada)
5. Fazer duas lavagens em xilol (10 min cada)
6. Cobrir a lâmina com a solução de selagem e lamínula
7. Visualizar em microscópio

PROTOCOLO D – IMUNO-HISTOQUÍMICA (CAPUTO, GITIRANA, MANSO, 2014, modificado)Imuno-histoquímica - colorimétrica

1. Deixar as lâminas com os cortes obtidos em estufa a 56°C por duas horas
2. Lavar 2x em xilol (20 min cada)
3. Lavar 2x em álcool 100% (10 min cada)
4. Lavar 1x em álcool 90% (5 min)
5. Lavar 1x em álcool 80% (5 min)
6. Lavar 1x em álcool 70% (5 min)
7. Lavar 2x em PBS (5 min cada)
8. Recuperação antigênica: submergir as lâminas em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) em micro-ondas por 4 min a 800W e por 2 ciclos de 5 min a 400W
9. Lavar 3x em PBST- 0,1% de Triton X-100 (5 min)
10. Bloquear inespecificidade com PBST+BSA 2% pH 7,4 (1h, t°C ambiente)
11. Incubar Ac 1° diluído (1:100) em PBST+BSA 1% por 16 a 18h em câmara úmida a 4°C
12. Lavar 3x em PBS (5 min cada)
13. Incubar as lâminas em peróxido de hidrogênio 3% em PBS (20 min)
14. Lavar 3x em PBS (5 min cada)
15. Incubar anti-Ac-biotinilado (1:4000) diluído em PBS por 1h em câmara úmida a t°C ambiente
16. Lavar 3x em PBS (5 min cada)
17. Incubar estreptavidina-peroxidase em câmara úmida, t°C ambiente (30 min)
18. Lavar 3x em PBS (5 min cada)
19. Incubar as lâminas em solução contendo 10mg de DAB diluídos em 10 ml de PBS e 150 ml de H₂O₂ 3%
20. Lavar as lâminas em água por 5 min
21. Contracorar com hematoxilina diluída (30 s)
22. Lavar em água corrente por 5 min
23. Desidratar: 5 min em cada álcool e 5 min em xilol. Montar a lâmina com lamínula e selante

Imuno-histoquímica fluorescente

1. Deixar as lâminas com os cortes obtidos em estufa a 56°C por duas horas
2. Lavar 2x em xilol (20 min cada)
3. Lavar 2x em álcool 100% (10 min cada)
4. Lavar 1x em álcool 90% (5 min)
5. Lavar 1x em álcool 80% (5 min)
6. Lavar 1x em álcool 70% (5 min)
7. Lavar 2x em PBS (5 min cada)
8. Recuperação antigênica: submergir as lâminas em tampão citrato de sódio 10 mM (pH 6,0), submeter em micro-ondas por 4 min a 800W e dois ciclos de 5 min a 400W
9. Lavar 3x em PBST – 0.1% triton X-100 (5 min)
10. Bloquear inespecificidade com PBST+BSA 2% pH 7.4 (1h, t°C ambiente)
11. Incubar Ac 1° diluído em PBST + BSA 1% por 16 a 18h em câmara úmida a 4°C.
12. Lavar 3x em PBS (5 min cada)
13. Incubar anti-Ac-FICT diluído em PBST por 2h em câmara úmida a t°C ambiente (nesta etapa em diante proceder ao abrigo de luz)
14. Lavar 3x em PBS (5 min cada)
15. Montar a lâmina com selante (glicerol e PBS, v/v) e fazer leitura em fluorescência

ANEXO

Carta de Aprovação da Comissão de Ética no uso de animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 193/2014

Londrina, 18 Dezembro de 2014

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 04 de Novembro de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado **"Imunofluorescência para detecção de micotoxinas: desenvolvimento e aplicação de nanoparticulados em produtos de origem animal"**, registrado sob o processo CEUA nº24700.2014.99, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 64 ovos embrionários (machos e fêmeas) da linhagem Cobb, com 8 dias de incubação e peso aproximado de 64g provenientes de granja comercial. O projeto tem como objetivo realizar análise histopatológica dos tecidos dos embriões de frango expostos à aflatoxinas e desenvolver imunotécnica fluorescente de alta sensibilidade para detecção desta toxina nos tecidos visando inovação tecnológica e desenvolvimento de novos biosensores. Para tanto, os ovos serão divididos em 4 grupos experimentais de acordo com as soluções que serão inoculadas (Grupo 1 – solução de veículo, sem micotoxina; Grupo 2 – 1,5 µg de AFB1/ovo; Grupo 3 – 3,0 µg de AFB1/ovo e Grupo 4 – 6,0 µg de AFB1/ovo). As soluções serão injetadas no 14º dia e os ovos serão eclodidos para análise 3 dias antes da eclosão natural (18º dia) permanecendo em contato com a toxina por 4 dias. Os ovos serão esterilizados com álcool 70% e posteriormente incubados a 37°C, será realizada rolagem duas vezes ao dia e ovoscopia diária até o período final de incubação, a casca será perfurada a 0,5 cm da parte pontiaguda com agulha hipodérmica e o local da injeção será selado com parafina. Os fígados e rins embrionários dos 10 animais de cada grupo serão dissecados e analisados por histopatologia e imunohistoquímica. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 14 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Illa. Sra.

Prof. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Sra. Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Chefe do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos e Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias.