



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLEVERSON FERREIRA SHIMIZU

**i-ELISA COMO FERRAMENTA AVALIADORA NA
OTIMIZAÇÃO DE IMUNOENSAIO E EXPOSIÇÃO
EXPERIMENTAL DE OCRATOXINA A (OTA) EM
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PINTAINHOS:
VIA ORAL *VERSUS* INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA**

CLEVERSON FERREIRA SHIMIZU

**i-ELISA COMO FERRAMENTA AVALIADORA NA
OTIMIZAÇÃO DE IMUNOENSAIO E EXPOSIÇÃO
EXPERIMENTAL DE OCRATOXINA A (OTA) EM
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PINTAINHOS:
VIA ORAL *VERSUS* INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA**

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

Orientadora: Dr^a Elisa Yoko Hirooka

Co-orientadora: Dr^a Eiko Itano Nakagawa

Londrina
2019

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

Shimizu, Cleverson Ferreira.

i-ELISA COMO FERRAMENTA AVALIADORA NA OTIMIZAÇÃO DE IMUNOENSAIO E EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE OCRATOXINA A (ÓTA) EM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PINTAINHOS: VIA ORAL VERSUS INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA / Cleverson Ferreira Shimizu. - Londrina, 2019.
69 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Coorientador: Eiko Itano Nakagawa.

dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2019.

Inclui bibliografia.

1. i-ELISA - . 2. otimização - . 3. ocratoxina - . 4. frango - . I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Nakagawa, Eiko Itano. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CLEVERSON FERREIRA SHIMIZU

**i-ELISA COMO FERRAMENTA AVALIADORA NA OTIMIZAÇÃO DE
IMUNOENSAIO E EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE OCRATOXINA
A (OTA) EM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PINTAINHOS:
VIA ORAL *VERSUS* INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência e Tecnologia 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. Daiane Dias Lopes
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Profa. Dra. Angélica Tieme Ishikawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Cássia Reika Takabayashi Yamashtia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 16 de abril de 2019

*A Deus,
À minha mãe e ao meu pai (in memoriam),
Aos meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, conhecimento transmitido, incentivo, paciência e apoio;

À Professora Dra. Eiko Nakagawa Itano pela co-orientação, conhecimento transmitido, colaboração e apoio;

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por todo aprendizado e incentivo;

À Coordenação e Chefia do Curso de Pós-graduação, pela atenção e colaboração;

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

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

Ao professor Dr. Guilherme Biz, pela ajuda com a análise estatística;

Ao Shahzad Akbar Khan pela colaboração em experimento;

À Dra. Angélica Tieme Ishikawa e à Doutoranda Livia Montanheiro Médice Zanin, por ceder os anticorpos monoclonais e pelos conhecimentos transmitidos;

Aos colegas de laboratório Renata Sobottka, André Ribeiro, Daiane Dias Lopes, Gervásio Hitoshi e Fernando Godo pela ajuda nas análises, pelos momentos de descontração e apoio;

Às estagiárias Nathália Tatakihara, Mariana Ribeiro Benfatti, Beatriz Bruniera, pela ajuda nas análises e colaboração, bem como Gabriel Silvério de Souza, Willian Hideki Chinen e Maria Laura.

Ao Professor Dr. Massami Shmimokomaki (*in memoriam*) por ter me aceitado e introduzido no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UEL.

À Professora Dra. Sandra Garcia por ter me orientado durante meu TCC de

graduação;

À Professora Dra. Fernanda Paião pelos conhecimentos transmitidos e colaboração nos projetos do meu TCC;

À Letícia Felipe por ter me ajudado em meu TCC;

À Cássia Reika Takabayashi Yamashita e Ana Lúcia De Souza M. Felício por terem me ensinado os primeiros passos quando entrei pela primeira vez no laboratório;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SHIMIZU, Cleverson Ferreira. **i-Elisa como ferramenta avaliadora na otimização de imunoenensaio e exposição experimental de ocratoxina a (OTA) em parâmetros hematológicos de pintainhos:** via oral *versus* inoculação subcutânea. 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O trabalho indica cuidados necessários para operação analítica – imunoenensaio – empregando ELISA indireta (i-ELISA) como ferramenta avaliadora em testes de imunorreagentes e, procedimentos para análise de ocratoxina A (OTA). Embora OTA seja o principal análogo nefrotóxico e hepatotóxico do grupo, apresenta toxicidade e carcinogenicidade inferior a aflatoxina B1. O experimento consistiu de: (i) tendo como anticorpo primário o anticorpo monoclonal anti-OTA (AcManti-OTA) produzido por hibridoma linhagem OTA.1, secretora de AcM - isotipo IgG1 kappa contra OTA, proceder i-ELISA com AcManti-OTA armazenado a -20°C. Iniciando com a concentração de 0,89 mg/mL e diluição de 1/100 do anticorpo primário, sendo que as avaliações consistiram desde testes perante direção de pipetagem, higienização da lavadora de microplaca, estabilidade de conjugado OTA-BSA e, comparação entre lotes de conjugado perante sensibilização de microplaca. A melhor condição para i-ELISA consistiu de: conjugado OTA-BSA a 100 ng/mL em tampão bicarbonato 0,1 mol L⁻¹pH 9,6; diluição de anticorpo primário para 1/5.000; anticorpo secundário a 1/4000; bloqueio com BSA a 0,01%. A avaliação de AcM perante produção, quantidade e viabilidade através de i-ELISA é fundamental para prosseguir com ensaios subsequentes. A maximização do uso de AcM produzido no laboratório permite redução de custo (atingiu redução no fator de 50) e rejeitos, garantindo o fornecimento de reagente dependente de Kit importado de alto valor comercial. (ii): o estudo comparativo de efeito no parâmetro hematológico de OTA em pintainho de linhagem Cobb consistiu de dois grupos submetidos a exposição oral e subcutânea. O grupo de exposição oral consistiu de 42 aves, de 01 dia de idade, expostos a ração contaminada com OTA nas doses de 0,0, 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 e 1,1 mg de OTA/kg de ração. O grupo de exposição subcutânea consistiu de 36 aves, de 05 dias de idade expostos por inoculação subcutânea de OTA nas concentrações de 0,0, 0,1; 0,5; 0,9; 1,3 e 1,7 mg de OTA/kg de peso corporal. O grupo da via subcutânea apresentou maior alteração em células hematológicas, desde a dose de 0,1 mg de OTA/kg, sugerindo efeito de OTA e respectivos metabólitos ao nível de medula óssea e órgãos linfóides. I.e., a contaminação via subcutânea possivelmente não expôs OTA a biotransformação hepato-digestiva responsável pela detoxicação capaz de transformar em análogo com menor toxicidade; este fator poderia justificar a maior toxicidade hematológica por via subcutânea, em relação a contaminação via oral.

Palavras-chave: Micotoxina. Ocratoxina. ELISA. Otimização. Frango.

SHIMIZU, Cleverson Ferreira. **i-ELISA as an evaluation tool in the immunoassay optimization and experimental exposition of ochratoxin A (OTA) in haematological parameters of broiler chicks: oral versus subcutaneous inoculation.** 2019. 69 p. Dissertation (Master in Food Science) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

This research pointed-out the care required during immuno-analytical operation employing indirect ELISA (i-ELISA) as a evaluation tool to test immunoreagents as well as the procedures for ochratoxin A (OTA) analysis. Although OTA is the major nephrotoxic and hepatotoxic analogue in ochratoxin group, its toxicity and carcinogenicity is lower than aflatoxin B1. The experiment was performed as: (i): using as the primary antibody, the anti-OTA monoclonal antibody (anti-OTA MAb) produced by hybridoma OTA.1 strain, which secretes isotype IgG1 kappa MAb against OTA, the i-ELISA was carried out with MAb against-OTA stored at -20°C. The evaluation was started diluting the primary antibody at 1/100, and it consisted from test to evaluate the pipetting direction, cleaning efficiency microplate washer, stability of OTA-BSA conjugate and comparison of conjugate batch concerning microplate sensitization. The best condition determined for i-ELISA was: 100 ng / mL of OTA-BSA conjugate in 0.1 mol L⁻¹ bicarbonate buffer at pH 9.6; dilution of primary antibody at 1/5000; secondary antibody at 1/4000; blocking with 0.01% BSA. The evaluation of MAb prior to production, quantity and viability using i-ELISA is essential to carry out subsequent tests. The maximization of the use of MAb produced in the laboratory can reduce the cost (a reduction factor of 50 was reached) as well as the waste, guaranteeing the supply of reagent which is dependent on imported as high cost commercial Kit. (ii) the comparative study concerning the effect of OTA in chicks haematological parameters was performed using two groups. The oral exposure group consisted of 42 chicks of 01 day old, which ingested OTA contaminated feed at doses of 0.0, 0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9 and 1.1 mg of OTA / kg of feed. The subcutaneous exposure group was composed by 36 chicks of 05 days old, that were subcutaneously inoculated with 0.0, 0.1; 0.5; 0.9; 1.3 and 1.7 mg OTA / kg of body weight. The subcutaneous injection group showed more prominent change in hematological cells, which was evidenced from 0.1 mg of OTA / kg dose, and suggested the effect of OTA and its metabolites at bone marrow and lymphoid organs level. I.e., the subcutaneous route probably skipped the OTA hepato-digestive biotransformation usually responsible for detoxification by transforming into a lower toxicity analogue; such feature may justify the higher hematological toxicity by subcutaneous route, when compared with oral route.

Key words: Mycotoxin. Ochratoxin. ELISA. Optimization. Chick.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01 – Ocratoxina A (HUSEIN et BRASEL, 2001)..... | 19 |
| Figura 02 – Sistema hapteno-molécula carreadora..... | 24 |
| Figura 03 – ELISA indireto | 26 |
| Figura 04 – Fluxograma geral - OTA: otimização de i-ELISA e comparação entre contaminação via ingestão versus subcutânea em pintainho | 29 |
| Figura 05 – Esquema de pipetagem de rotina em microplaca | 32 |
| Figura 06 – Teste comparando tempo de pipetagem na rotina (a) versus microplaca teste (b) | 33 |
| Figura 07 – Lavorada de microplaca e seus componentes | 34 |
| Figura 08 – Pente de lavagem: suporte para agulha de ejeção de PBST e canaleta para aspiração em formato de pente em lavadora de microplaca..... | 34 |
| Figura 09 – Esquema de etapas de i-ELISA otimizado | 45 |
| Figura 10 – Efeitos de OTA em medula óssea e órgãos de sistema imunológico..... | 55 |
| Figura 11 – Detalhamento de efeitos de OTA em medula óssea..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 01 – Limites máximos tolerados para ocratoxina em alimentos de acordo com a RDC N° 7 de 18 de fevereiro de 2011 (RDC N° 07, de 18 de fevereiro de 2011 | 20 |
| Tabela 02 – Parâmetros da Comissão Européia para OTA de acordo com o gênero alimentício e seus níveis máximos por (µg/kg)..... | 21 |
| Tabela 03 – Orientação para valores máximos de OTA para produtos destinados a alimentação animal..... | 22 |
| Tabela 04 – Critério para determinação de ocratoxina A pela legislação da Comunidade Européia (2006) | 23 |
| Tabela 05 – Parâmetros testados na otimização de concentração e diluição de reagentes básicos para o ensaio i-ELISA | 32 |
| Tabela 06 – Resultado de leitura com empregando o procedimento clássico de pipetagem | 36 |
| Tabela 07 – Resultado de leitura com sequenciamento alternado | 37 |
| Tabela 08 – Avaliação estatística das médias de leitura de microplacas - pipetagem clássica <i>versus</i> pipetagem com sequenciamento alternado | 38 |
| Tabela 09 – Tempo em dias de conjugado em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1 mol L ⁻¹ pH 9,6 e suas respectivas leituras | 39 |
| Tabela 10 – Efetividade de conjugado OTA-BSA..... | 42 |
| Tabela 11 – Comparação estatística dos dois lotes de conjugado (p<0,05). Teste – T..... | 42 |
| Tabela 12 – Determinação da diluição de AcM anti-OTA para análise de OTA por i-ELISA..... | 44 |
| Tabela 13 – Comparação de resultados obtidos na contaminação oral e subcutânea | 53 |
| Tabela 14 – Metabólitos de OTA..... | 57 |

CAPÍTULOS

| | |
|---|----|
| I – OCRATOXINA A (OTA); i-ELISA COMO FERRAMENTA AVALIADORA NA OTIMIZAÇÃO DE IMUNOENSAIO | 33 |
| II – EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DE OCRATOXINA A (OTA) EM PARÂMETRO HEMATOLÓGICOS DE PINTAINHOS: INGESTÃO DE RAÇÃO VERSUS INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| Ac | Anticorpo |
| AcM | Anticorpo Monoclonal |
| AFB1 | Aflatoxina B1 |
| AFB2 | Aflatoxina B2 |
| AFG1 | Aflatoxina G1 |
| AFG2 | Aflatoxina G2 |
| aw | Atividade de água (<i>water activity</i>) |
| BEN | Nefropatia Endêmica dos Balcãs |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina de soro bovino |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CV | Coefficiente de Variação |
| dc-ELISA | ELISA Competitivo Direto (<i>Direct Competitive ELISA</i>) |
| EC | <i>Europe Commission</i> |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| i.e. | Isto é (<i>id est</i>) |
| i-ELISA | ELISA indireto (<i>Indirect Enzyme Linked Immuno Assay</i>) |
| ic-ELISA | ELISA competitivo indireto(<i>Indirect Competitive Enzyme Linked Immuno Assay</i>) |
| LC-MS/MS | Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massa |
| OTA | Ocratoxina A |
| PBS | Tampão fosfato de sódio |
| PBST | Tampão fosfato de sódio-Tween |
| TMB | 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 | MICOTOXINAS..... | 16 |
| 2.1.1 | Ocratoxina..... | 18 |
| 2.2 | PARÂMETRO DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) SOBRE A OCRATOXINA A | 20 |
| 2.3 | PARÂMETRO DA COMISSÃO EUROPÉIA EM RELAÇÃO À OCRATOXINA | 21 |
| 2.4 | METODOLOGIA ANALÍTICA NA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA | 22 |
| 3 | CONCEITOS BÁSICOS RELATIVOS A ANTICORPOS E ANTÍGENOS | 24 |
| 4 | TIPOS DE IMUNOENSAIO | 26 |
| 4.1 | ELISA INDIRETO | 26 |
| 5 | OBJETIVOS | 27 |
| 5.1 | GERAL | 27 |
| 5.2 | ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 5.3 | GERAL | 27 |
| 5.4 | ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 6 | MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 7 | CAPÍTULO I - OCRATOXINA A (OTA): I-ELISA COMO FERRAMENTAAVALIADORA NA OTIMIZAÇÃO DE IMUNOENSAIO | 30 |
| 7.1 | MATERIAIS..... | 31 |
| 7.2 | METODOLOGIA | 32 |
| 7.2.1 | Parâmetros Considerados para Otimização de i-ELISA Para Análise de OTA | 32 |
| 7.2.2 | Efeito da Direção de Pipetagem no Tempo de Reação..... | 32 |
| 7.2.3 | Higienização (Limpeza) da Lavadora de Microplaca..... | 33 |
| 7.2.4 | Estabilidade de Conjugado OTA-BSA | 35 |
| 7.2.5 | Comparação Entre Dois Lotes de Conjugados OTA-BSA..... | 35 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 8 | RESULTADOS E DISUSSÃO | 36 |
| 8.1 | PARÂMETROS CONSIDERADOS PARA OTIMIZAÇÃO DE I-ELISA PARA ANÁLISE DE OTA | 36 |
| 8.2 | EFEITO DA DIREÇÃO DE PIPETAGEM NO TEMPO DE REAÇÃO..... | 36 |
| 8.3 | HIGIENIZAÇÃO (LIMPEZA) DA LAVADORA DE MICROPLACA..... | 38 |
| 8.4 | ESTABILIDADE DE CONJUGADO OTA-BSA | 38 |
| 8.5 | COMPARAÇÃO ENTRE DOIS LOTES DE CONJUGADOS DE OTA-BSA..... | 41 |
| 9 | DISCUSSÃO | 46 |
| 10 | CONCLUSÃO | 47 |
| 11 | CAPÍTULO II - EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DEOCRATOXINA A (OTA) EM PARÂMETRO HEMATOLÓGICOS DE PINTAINHOS: INGESTÃO DE RAÇÃO VERSUS INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA | 48 |
| 11.1 | RESUMO..... | 49 |
| 11.2 | INTRODUÇÃO | 49 |
| 11.3 | MATERIAL | 50 |
| 11.3.1 | Aves | 50 |
| 11.3.1.1 | Grupo 01 – contaminação com OTA via alimentação..... | 50 |
| 11.3.1.2 | Preparo da ração contaminada com OTA | 50 |
| 11.3.1.3 | Delineamento experimental | 50 |
| 11.3.2 | Grupo 02 – contaminação com OTA pela via subcutânea..... | 51 |
| 11.3.2.1 | Preparação da OTA..... | 51 |
| 11.3.2.2 | Delineamento experimental | 51 |
| 12 | RESULTADOS E DISUCUSSÃO | 52 |
| 13 | GRUPO 01 (INOCULAÇÃO ORAL) X GRUPO 02 (INOCULAÇÃO VIA SUB-CUTÂNEA) | 55 |
| 14 | CONCLUSÃO | 58 |
| 15 | CONSIDERAÇÕES GERAIS | 59 |
| 16 | BIBLIOGRAFIA | 60 |

1. INTRODUÇÃO

Toxinas naturais são metabólitos secundários sintetizados por planta, animal ou micro-organismo, com caráter nocivo para outro organismo. Na categoria destacam-se as micotoxinas produzidas por fungos fitopatógenos ou bolores saprófitos, capazes de crescer e contaminar uma ampla variedade de alimentos e ração animal.

O termo micotoxina surgiu da combinação de palavra grega ‘*mykes*’ – fungos com o latim “*toxicum*” – veneno (TURNER; SUBRAHMANYAN; PILETSKY, 2009). Embora as micotoxinas, aparentemente, não denotem importância bioquímica no crescimento fúngico, a ingestão, inalação e/ou contato com a pele causam micotoxicose em humanos e animais, sendo caracterizadas como não-transmissíveis não-contagiosas ou infecciosas e, as drogas e antibióticos são não-efetivos no tratamento (HUSSEIN; BRASEL, 2001; OKOLI et al., 2007; MARIN et al., 2013).

Micotoxinas são produzidas por uma variedade de fungo, especialmente do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. As aflatoxinas são produzidas principalmente por *Aspergillus* spp. pertencentes a espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* de distribuição mundial.

A aflatoxina B₁ (AFB₁) se destaca pela toxicidade e carcinogenicidade, sendo classificada no grupo 1 pelo IARC (*International Agency for Research on Cancer*, 1993), i.e. comprovadamente cancerígena ao humano. Aflatoxina contamina milho, trigo, farinha de trigo, cevada, nozes, pistache, arroz, amêndoa, feijão, semente de algodão, coco, gengibre, pimenta e pimenta malagueta, frutas, pimentão-doce, frutas secas e cerveja, além da contaminação indireta em produtos de origem animal através da ingestão de ração. Aflatoxicose em ave e suíno resulta em perda de peso, redução de conversão alimentar e morte, dependendo de quantidade ingerida e tempo de exposição e, subsequente perda econômica.

O ensaio experimental empregando AFB₁ expõe os executores ao perigo contínuo de analito altamente tóxico e cancerígeno, cuja dose crônica e cancerígena, na maioria das vezes é imperceptível ao laboratorista. No contexto, a ocratoxina A (OTA), caracterizada pela toxicidade e carcinogenicidade inferior a aflatoxina B₁, seria um analito alternativo destinado ao estudo experimental em modelo animal. Outrossim, a OTA é o principal análogo nefrotóxico e hepatotóxico do grupo, sendo classificada em 2B pela IARC.

A OTA apresenta massa molecular de 403,815 g/mol e intensa fluorescência verde sob luz ultravioleta em meio ácido e, azul em meio alcalino. A toxina é solúvel em solventes

orgânicos polares (alcoóis, cetonas, clorofórmio), ácidos ou neutros, levemente solúvel em água e, insolúvel em éteres de petróleo e hidrocarbonos saturados. A OTA solubiliza em soluções alcalinas em geral, com destaque ao bicarbonato de sódio, justificando este como reagente de escolha para ensaios visando análise de ocratoxina.

OTA é produzida por amplo número de fungos incluindo *Aspergillusochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. mellus* e outras espécies de *Aspergillus*. Entre *Penicillium* spp. produtor de OTA citam-se *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. viridicatum*, *P. cyclopium* e *P. variable*.

OTA pode contaminar cereais - trigo, aveia, arroz, cevada, milho, vinho, suco de uva, principalmente em países de clima temperado; frutas secas em sul da Ásia e sudeste da Europa; soma-se ainda o feijão, cacau, café, entre outros. A ocorrência em milho, importante matéria-prima de ração, pode desencadear ocratoxicose, causando a perda de peso, redução de conversão alimentar em ave e suíno, com impactante perda econômica.

A detecção clássica de micotoxinas baseia-se em cromatografia, sendo empregada desde a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a diferentes modalidades de detector. Entretanto, o alto custo de análise por CLAE, aliado à despesa de manutenção e necessidade de operador experiente dificulta a ampla disseminação ao nível de usuário do setor produtivo.

O ensaio imunoquímico ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) vem apontando como método rápido de escolha na análise de micotoxinas pela sensibilidade, rapidez, precisão, segurança, custo reduzido, simplicidade acoplada ao uso de tampão, um reagente de menor toxicidade. A possibilidade de aplicação a diferentes matrizes, desde que a etapa de *clean-up* esteja em conformidade é bastante atraente, além de análise simultânea de amplo número amostras.

Embora versátil, a constituição biológica de caráter proteico de anticorpo expõe o reagente à desnaturação devido a solventes orgânicos, assim como sensibilidade à variação de temperatura e alto custo de Kits comerciais importados. O nosso domínio perante produção de AcM decorre da disponibilidade de hibridoma produtor de AcManti-micotoxina e, abre perspectiva promissora visando a redução de custo, rejeitos e desenvolvendo reagentes laboratoriais nacionais *in loco*, devendo-se explorar os cuidados principalmente referente à estabilização de anticorpo produzido perante manutenção de atividade Ag-Ac.

O trabalho visou na primeira etapa, contribuir apontando os cuidados necessários durante otimização / desenvolvimento de imunoensaio empregando ELISA indireto (i-ELISA). Na segunda etapa procedeu-se o estudo comparativo de efeito da administração de

OTA – exposição oral versus administração subcutânea no parâmetro hematológico em pintainho.

Com uma pesquisa simples e eficiente, utilizando reagentes antigos, foi possível detectar e corrigir problemas rotineiros e, principalmente, o aumento da diluição em 50 vezes do artícorpo primário foram os principais diferenciais deste trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micotoxinas

Toxinas naturais podem ser definidas como substâncias sintetizadas por espécimes de planta, animal ou micro-organismo, com caráter nocivo para outro organismo. Na categoria destacam-se as micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos fitopatógenos ou bolores saprófitos capazes de crescerem em ampla variedade de alimentos, incluindo a ração animal.

O termo micotoxina surgiu da combinação de palavra grega ‘*mykes*’ – fungos com o latim “*toxicum*” – veneno (TURNER; SUBRAHMANYAN & PILETSKY, 2009).

Embora as micotoxinas, aparentemente, não denotem importância bioquímica no crescimento fúngico, a sua ingestão, inalação e/ou contato com a pele causam micotoxicose em humanos e animais, sendo caracterizadas como não transmissíveis, não contagiosas ou infecciosas e as drogas e antibióticos são inefetivos no tratamento (HUSSEIN; BRASEL, 2001; OKOLI et al., 2007; MARIN et al., 2013).

Os fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* spp., *Penicilium* spp. e *Fusarium* spp. constituem os principais micotoxigênicos da cadeia alimentar, sobretudo de cereais. Estima-se a contaminação aproximada de micotoxinas em 25% de culturas alimentícias no mundo (CHOUDHARY & KUMARI, 2010). O crescimento fúngico depende de temperatura (ótima 25-30°C), umidade (>11,0%), aeração do substrato, atividade de água e estado fisiológico de fungo (GARCIA et al., 2012 e TESSARI & CARDOSO, 2012). O fungo incide em toda etapa de cadeia produtiva, desde a pré-colheita durante o crescimento de planta, colheita, secagem, a armazenamento de grãos. Determinadas condições como práticas agrícolas inadequadas, secagem ineficiente, manipulação de alimentos, armazenamento, embalagem e condição inadequada de transporte podem promover o desenvolvimento fúngico e subsequente produção de micotoxinas capazes de persistirem no armazenamento, resistirem ao processamento pela estabilidade química e térmica, constituindo em perigo natural na cadeia produtiva de alimento (DORNER, 2008; TURNER; SUBRAHMANYAN; PILETSKY, 2009; SOUZA, et. al., 2013 e MARIN et al., 2013). Não obstante, a presença de um fungo micotoxigênico não implica em contaminação, sendo a produção dependente de fatores variados, assim como fungo ausente não garante a ausência de micotoxinas (TURNER; SUBRAHMANYAN; PILETSKY, 2009).

A contaminação direta decorre da ingestão de cereais ou derivados contaminados, enquanto a indireta deve-se ao consumo dos produtos de origem animal – carne, leite e ovos, resultante de micotoxinas oriundas de alimentação animal, constituída basicamente de cereais (MARIN et al., 2013). O efeito depende de micotoxina acumulada em órgãos e tecidos, sendo a magnitude de toxicidade em humanos e animais afetada pela espécie, mecanismos de ação, metabolismo e mecanismo de defesa individual (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

As aflatoxinas foram descobertas em 1960, após a morte de aproximadamente 100 mil perus na Inglaterra (*Turkey X disease*) que consumiram ração contendo torta de amendoim contaminada proveniente do Brasil (ONO, et al. 2016)

São conhecidos ao menos 20 análogos, dos quais os principais são aflatoxina B₁ (AFB₁), AFB₂, AFG₁ e AFG₂. A AFB₁ é o análogo mais frequente e mais tóxico, seguido por AFG₁, AFB₂ e AFG₂, que exibem toxicidade de 50%, 20% e 10% em relação à AFB₁, respectivamente. As AFB₁ e AFG₁ contêm um anel diidrofurano, e as AFB₂ e AFG₂ contêm um tetradidrofurano (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Os produtos agrícolas com maior risco de contaminação por aflatoxinas são amendoim, milho, castanha-do-pará, pistache, pimenta e figo (CAST - *Council for Agricultural Science and Technology*, 2003). E têm sido encontradas em uma ampla variedade de alimentos, incluindo leite, cerveja, chocolate, uva passa, produtos à base de soja, entre outros. A aflatoxina M1 (AFM₁), que é um produto da metabolização da AFB₁ dos organismos de animais lactentes, é a forma mais frequente em leite e derivados (EGMOND, 1989).

A intoxicação provocada pela ingestão de aflatoxinas, denominada aflatoxicose, pode ocorrer de forma aguda ou crônica em seres humanos e animais. A aflatoxicose aguda em seres humanos é caracterizada por febre alta, vômito, colúria, edema dos pés, icterícia, desenvolvimento de ascite, hipertensão portal e apresenta uma alta taxa de mortalidade (AZZIZ-BAUMGARTNER et al, 2005) . Além disso, duas doenças humanas de etiologia indefinida têm sido associadas ao consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas: Kwashiorkor e síndrome de Reye. Por outro lado, a exposição crônica está associada ao câncer hepático e pulmonar, alterações na resposta imunológica e diminuição na concentração de selênio plasmático (CHEN, et al, 2000).

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas em animais incluem redução do peso corporal e alterações na atividade de macrófagos em aves (SMITH, et al, 1992) e redução do ganho de peso em suínos (RONCADA et al., 2004).

2.1.1. Ocratoxina

A família de ocratoxina inclui inúmeros análogos, sendo a Ocratoxina A a representante mais importante. Ocratoxina A, ou OTA, é produzida por espécies de *Aspergillus* (*A. ochraceus*) e *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. viridicatum*), sendo OTA sintetizada em condições variadas. A temperatura ótima para a síntese de OTA pelo *Aspergillusochraceus* é de 28°C, essa síntese é baixa à 15 ou a 37°C. Por outro lado, a produção de OTA por *Penicilliumviridicatum* ocorre entre 4 e 30°C. Em regiões mais frias, OTA é produzida principalmente pelo *Penicillium* spp., enquanto que em regiões mais quentes é sintetizada principalmente por *Aspergillus* spp. (POHLAND, NESHEM, FRIEDMAN, 1992).

Quimicamente, a OTA (7-[L-fenilalanilcarbonil] carboxil-5-cloro-8 hidróxi-3,4-diidro-3R metiliscumarina) consiste de uma diidroisocumarina ligada através de seu grupo 7- carboxil, por uma ligação amida, à L-fenilalanina (XIAO et al., 1995). Sendo uma molécula de polaridade média e alta estabilidade térmica, caracteriza-se pela presença de grupos cromóforos com propriedades fluorescentes sob luz UV a 335nm. Por outro lado, o caráter isocumarina da molécula e o grupo carbonilactona conferem a atividade tóxica (XIAO et al., 1996).

A evidência de propriedades toxicológicas da OTA em várias espécies animais se deve a efeitos nefrotóxicos e ação teratogênica, citotóxica, imunotóxica, genotóxica, imunossupressora e possivelmente carcinogênica (FINK-GREMMELS; JAHN; BLOOM, 1995). Os mecanismos envolvidos decorrem da redução na síntese protéica por inibição competitiva na atividade de fenilalanina-RNA-sintetase, devido a semelhança estrutural entre OTA e fenilalanina; inibição de respiração mitocondrial com depleção de síntese de ATP e aumento na peroxidação lipídica (XIAO et al., 1995). Aliado a efeitos primários, o processo de biotransformação hepática da OTA, com formação de intermediários reativos instáveis, emerge como elemento contribuinte na genotoxicidade e mutagenicidade da toxina, cujo mecanismo de ação consiste em ataque direto, ou bioativação de OTA no organismo animal (FINK-GREMMELS; JAHN & BLOM, 1995)

A nefrotoxicidade em humanos foi sustentada pela provável associação de OTA com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (BEN), uma disfunção renal crônica degenerativa capaz de induzir falência renal, que atingiu população adulta da área rural da região (PLESTINA, 1996). PFOHL-LESZKOWICZ et al. (2002), baseados na relação entre BEN e tumores do

trato urinário, constataram a possível participação de OTA na etiologia de uropatias endêmicas.

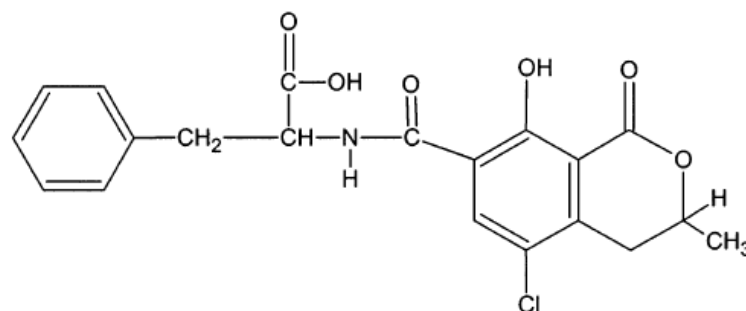
A ocratoxina A é classificada no grupo 2B segundo a IARC, sendo possivelmente carcinogênica para humanos (OSTRY et al, 2016). O envolvimento de OTA em câncer testicular na Europa é sustentado pelo alto consumo de alimentos, considerados como prováveis fontes da toxina na região (SCHWARTZ, 2002). Estas propriedades tóxicas refletiram também em perdas econômicas na avicultura por nefropatia na Bulgária, devido a ração contaminada por OTA e outras micotoxinas (PLESTINA, 1996, STOEV, et al., 2002).

OTA ocorre comumente em cereais, cerveja, especiarias, café, produtos de cacau, vinho, frutas secas, suco de uva (JØRGENSEN, 2005). Trigo e milho têm sido reportados como substrato para o crescimento fúngico e produção de OTA (MARIN, et al., 2013). A ocorrência natural de OTA em milho e seus derivados é problema mundial (DUARTE, PENA& LINO, 2010).

Ocratoxina A é mais tóxica e mais comum que a ocratoxina B ou a ocratoxina C (GIANCARLO et al., 2011). Por isso, é considerada a mais importante e mais estudada do grupo.

A transferência de micotoxinas de ração contaminada para os animais tem resultado na detecção de OTA em tecidos de aves e suínos (fígado, rim, músculo e ovos) (ZÖLLNER &MAYER-HELM, 2006).

Figura 01. Ocratoxina A (HUSEIN & BRASEL, 2001).



Em frangos de corte, os sintomas clínicos mais evidentes são baixo crescimento, redução da eficiência alimentar e aumento de ingestão de água devido à lesão renal (JOO et al., 2013), de modo semelhante, diminuição no peso corporal foi reportado por diferentes trabalhos em frango de corte e poedeira (ELAROSSI et al, 2006; HANIF et al, 2008). Os dois fatores mais importantes são nível e período de exposição para a diminuição do peso corporal. A redução no consumo de ração foi mais evidente com tempo e com maior consumo

de OTA. O efeito da OTA na relação de conversão alimentar cumulativa foi dependente de dose (ELAROUSSI et al., 2006.)

O efeito de OTA em fígado e rim é mais evidente, porque ambos estão envolvidos na detoxificação e eliminação de OTA do corpo. Aumento no tamanho desses órgãos tem sido reportado e aumento do peso relativo de fígado e rim foi observado em dieta com níveis mais baixos de OTA quando comparado com aqueles reportados anteriormente (ELAROUSSI et al., 2006). O aumento do fígado e rins é, provavelmente, devido ao alargamento do epitélio e aumento da hiperemia ou infiltração de células mononucleares nesses órgãos. Como a OTA tem uma elevada capacidade de ligação às proteínas plasmáticas devido à qual a sua eliminação através da filtração glomerular pode ser retardada. Ocratoxina A é também excretada através da rota hepatobiliar, circulação entero-hepática e reabsorção nos túbulos pode levar à mudanças degenerativas e alargamento das células epiteliais do fígado e rim (STOEV et al., 2000).

2.2 Parâmetro da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sobre a ocratoxina A

A ANVISA, através da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011 estabeleceu os limites máximos tolerados (LMT) de ocratoxina A em alimentos (Tabela 01) (RDC Nº 07, de 18 de fevereiro de 2011)

Tabela 01: Limites máximos tolerados para ocratoxina em alimentos de acordo com a RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 (RDC Nº 07, de 18 de fevereiro de 2011).

| Micotoxina | Alimento | LMT ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|--------------|---|---------------------------------|
| Ocratoxina A | Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada | 10 |
| | Feijão | 10 |
| | Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel | 10 |
| | Vinho e seus derivados | 2 |
| | Suco de uva e polpa de uva | 2 |
| | Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão- doce) Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristicafragrans (noz-moscada) Zingiberofficinale (gingibre) Curcuma longa (curcuma) Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas | 30 |
| | Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância) | 2 |
| | Produtos de cacau e chocolate | 5 |
| | Amêndoa de cacau | 10 |
| | Frutas secas e desidratadas | 10 |

2.3 Parâmetro da Comissão Europeia em relação à Ocratoxina A

A Comissão Europeia, através do REGULAMENTO (CE) N. o 1881/2006 de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios (Tabela 01).

Tabela 02. Parâmetros da Comissão Europeia para OTA de acordo com o gênero alimentício e seus níveis máximos por ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

| Gêneros alimentícios | | Teores máximos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|----------------------|--|--|
| 2.2.1 | Cereais não transformados | 5,0 |
| 2.2.2 | Todos os produtos derivados de cereais não transformados, incluindo produtos à base de cereais transformados e cereais destinados ao consumo humano direto, com exceção dos gêneros alimentícios referidos nos pontos 2.2.9, 2.2.10 e 2.2.13 | 3,0 |
| 2.2.3 | Passas de uvas (uvas de Corinto, uvas e sultanas) | 10,0 |
| 2.2.4 | Café torrado, moído ou em grão, com exceção do café solúvel | 5,0 |
| 2.2.5 | Café solúvel (café instantâneo) | 10,0 |
| 2.2.6 | Vinho (incluindo vinho espumante e excluindo vinho licoroso e vinho com teor alcoométrico não inferior a 15 % vol.) e vinho de frutos (11) | 2,0 |
| 2.2.7 | Vinho aromatizado, bebidas aromatizadas à base de vinho e cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas (13) | 2,0 |
| 2.2.8 | Sumo de uva, concentrado de uva reconstituído, néctar de uva, mosto de uva e concentrado de mosto reconstituído, destinados ao consumo humano directo (14) | 2,0 |
| 2.2.9 | Alimentos à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens (3) (7) | 0,50 |
| 2.2.10 | Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos (9) (10) especificamente destinados a lactentes | 0,50 |
| 2.2.11 | Especiarias, incluindo especiarias secas <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristicafragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiberofficinale</i> (gengibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma) <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentos, pimentos em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce) Misturas de especiarias que contenham uma das especiarias acima indicadas | 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ até 31.12.2014 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a partir de 1.1.2015 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| 2.2.12. | Alçaçuz (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> e outras espécies) | |
| 2.2.12.1. | Raiz de alçaçuz, ingrediente para infusão de ervas aromáticas | 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| 2.2.12.2. | Extracto de alçaçuz (42), para utilização em alimentos, sobretudo em bebidas e produtos de confeitaria | 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| 2.2.13 | Glúten de trigo não vendido diretamente ao consumidor | 8,0 |

REGULAMENTO (CE) N. o 1881/2006 DA COMISSÃO de 19 de Dezembro de 2006

Através da RECOMENDAÇÃO DA COMISSÃO de 17 de Agosto de 2006 - (2006/576/CE) a Comissão Europeia cita os valores máximos permitidos de ocratoxina, para produtos destinados a alimentação animal (Tabela 02).

Tabela 03. Orientação para valores máximos de OTA para produtos destinados a alimentação animal.

| Micotoxina | Produtos destinados à alimentação animal | Valor de orientação (mg/kg de ração, umidade de 12 %) |
|-------------------|---|---|
| Ocratoxina A | Matérias-primas para alimentação animal (*) — Cereais e produtos à base de cereais (**) | 0,25 |
| | Alimentos complementares e alimentos completos para animais — Alimentos complementares e alimentos completos para suínos | 0,05 |
| | — Alimentos complementares e alimentos completos para aves de capoeira | 0,1 |

(*) Deve ser prestada particular atenção aos cereais e produtos à base de cereais diretamente consumidos pelos animais, de modo a assegurar que a sua utilização na ração diária não leve a que o nível de exposição do animal a estas micotoxinas seja superior aos níveis de exposição correspondentes, quando se utilizam apenas alimentos completos na ração diária.

(**) O termo «Cereais e produtos à base de cereais» inclui não apenas as matérias-primas para alimentação animal enumeradas no capítulo 1 «Grãos de cereais, respectivos produtos e subprodutos», da lista não exaustiva das principais matérias-primas para alimentação animal referida na parte B do anexo da Diretiva 96/25/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa à circulação de matérias-primas para alimentação animal (JO L 125 de 23.5.1996, p. 35), mas, também, outras matérias-primas para alimentação animal derivadas de cereais, em particular de forragens de cereais e alimentos grosseiros.

REGULAMENTO (CE) N. 401/2006 DA COMISSÃO de 23 de Fevereiro de 2006.

Em relação às carnes e produtos de origem animal, quanto a mesma toxina, o documento diz que a ocratoxina A pode transferir-se dos alimentos para animais para os alimentos de origem animal, mas as avaliações da exposição indicam que os alimentos de origem animal pouco contribuem para a exposição dos seres humanos à ocratoxina A, por via alimentar, não estabelecendo valores de OTA para produtos de origem animal (RC (2006/576/CE)).

A SCOOP (*Scientific Cooperation On Questions Relating To Food*) na Avaliação da ingestão dietética de Ocratoxina A pela população dos Estados-Membros da UE -Relatório dos peritos participantes na Tarefa 3.2.7 publicou como média de OTA encontrados em carnes da França, Itália, Alemanha e Reino Unido, o valor médio de 0,830 µg/kg em 1860 amostras (TASK 3.2.7).

2.4 Metodologia analítica para determinação de ocratoxina

Tendo em vista que a contaminação de produtos agrícolas por fungos toxigênicos e micotoxinas é difícil de evitar, um monitoramento contínuo de grãos, alimentos e rações por

meio de métodos sensíveis e precisos é essencial para minimizar os efeitos tóxicos e as perdas econômicas.

Os métodos convencionais de identificação e detecção de fungos incluem o cultivo em diversos meios, exame microscópico e análises químicas de quitina, ergosterol ou metabólitos secundários. Com exceção do último, que inclui micotoxinas, os demais métodos apresentam baixa especificidade e reprodutibilidade e consomem muito tempo. Os estudos de sistemática molecular, apesar de possuírem alta especificidade, também apresentam custo elevado (PITT & HOCKING, 2009).

As micotoxinas são geralmente detectadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC), cromatografia gasosa e espectrometria de massa (KOLOSOVA, et al, 2006). A cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS/MS) tem sido utilizada para a determinação simultânea de várias micotoxinas com baixos limites de detecção. Contudo, a necessidade de uma extensa pré-limpeza da amostra, o que aumenta os custos, a utilização de solventes e as limitações da análise *in situ* tornam necessária a utilização de técnicas alternativas (KOLOSOVA, et al, 2006).

Os métodos imunológicos para a detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas constituem técnicas alternativas promissoras. Esses métodos apresentam várias vantagens, como facilidade de operação, especificidade e alta sensibilidade, além de não requererem etapa extensiva de pré-limpeza de amostra, permitem a análise simultânea de várias amostras, não utilizam reagentes tóxicos e podem ser realizados no campo (KRSKA & MOLINELLI, 2007).

Tabela 04. Critério para determinação de ocratoxina A pela legislação da Comunidade Européia (2006).

| Nível (µg/kg) | Ocratoxina A | | |
|------------------|----------------------|------------------------|-----------------|
| | DP _r *(%) | DP _R ** (%) | Recuperação (%) |
| <1 | ≤40 | ≤60 | 50-120 |
| 1-10 | ≤20 | ≤30 | 70-110 |

*DP_r = desvio padrão (repetibilidade); **DP_R = desvio padrão (reprodutibilidade)

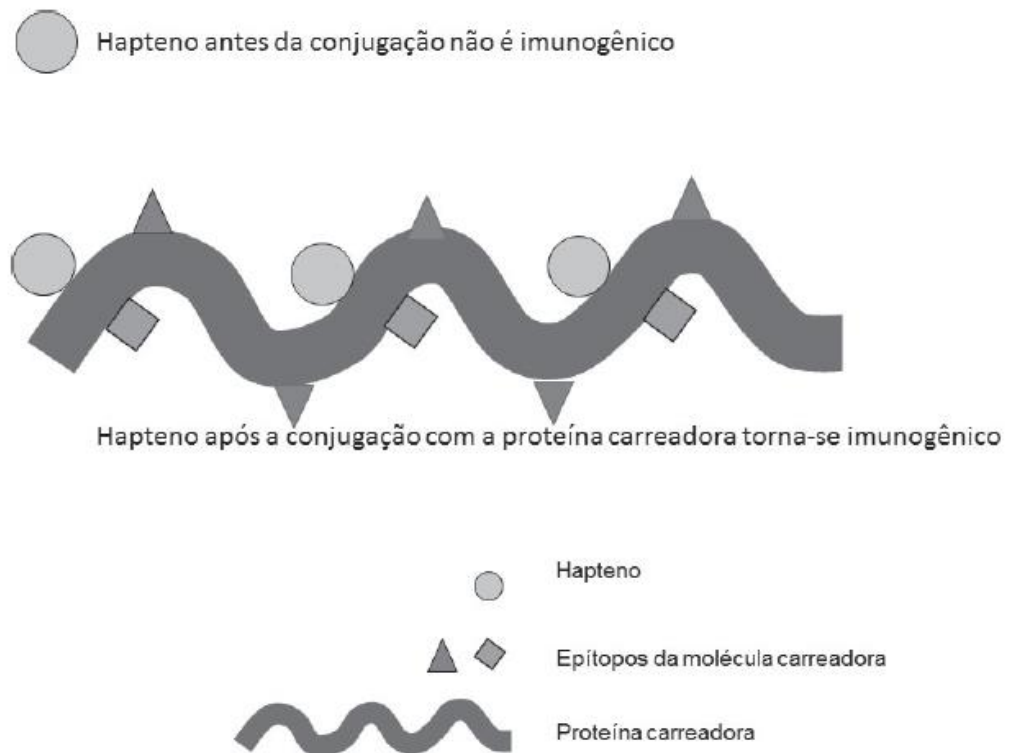
Este fato possibilita a inserção de técnicas imunológicas com relação à análise reconhecida, com destaque especial a métodos rápidos baseados em anticorpo específico, seja poli ou monoclonal. i.e., o desenvolvimento de imunoferramentas aliando as mais variadas

tecnologias, tendo como base o ensaio imunoenzimático – ELISA e coluna de imunoafinidade, e avançar para inovação tecnológica rápida com ênfase a biosensores.

3. Conceito Básico Relativo a Anticorpo e Antígeno

Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B em resposta principalmente a patógenos como vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos. Os linfócitos B podem produzir anticorpos contra praticamente qualquer antígeno. Há cinco classes de anticorpos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Nos ensaios imunológicos, geralmente são utilizados anticorpos IgG. Os sítios de ligação, localizados na extremidade N-terminal dos anticorpos, ligam-se a regiões dos antígenos denominadas epítopos. Os antígenos que induzem uma resposta imune são denominados imunógenos. Antígenos de baixa massa molecular que para induzir uma resposta imune precisam ser conjugados com moléculas carreadoras (proteínas como albumina bovina e ovalbumina) são denominados haptenos (Figura 02) (ONO, et al 2016).

Figura 02. Sistema hapteno-molécula carreadora.



A molécula de hapteno, devido à baixa massa molecular, não apresenta imunogenicidade. Porém, quando conjugada à molécula carreadora, torna-se imunogênica(ONO, et al. 2016).

Devido à propriedade de interagir com antígenos com alta especificidade, os anticorpos podem ser utilizados como ferramentas para a detecção qualitativa ou quantitativa de diferentes moléculas. Os anticorpos podem ser produzidos em animais como coelhos, ratos e camundongos por meio da inoculação do animal com várias doses do antígeno e posterior purificação dos anticorpos do soro hiperimune. Embora a produção desses anticorpos, denominados policlonais, seja relativamente simples e de baixo custo, devido ao fato de ser resultante da ativação de vários clones de linfócitos B pode ocorrer reatividade cruzada com antígenos diferentes dos utilizados na imunização.

Os anticorpos monoclonais, por sua vez, são produzidos por meio da fusão de células B tumorais com células B de camundongos isogênicos e, embora sejam tecnicamente mais difíceis de serem produzidos, constituem reagentes homogêneos, de maneira que um determinado anticorpo monoclonal possui apenas um tipo de sítio de ligação ao antígeno e, conseqüentemente, liga-se a um único epítipo (ONO, et al 2016).

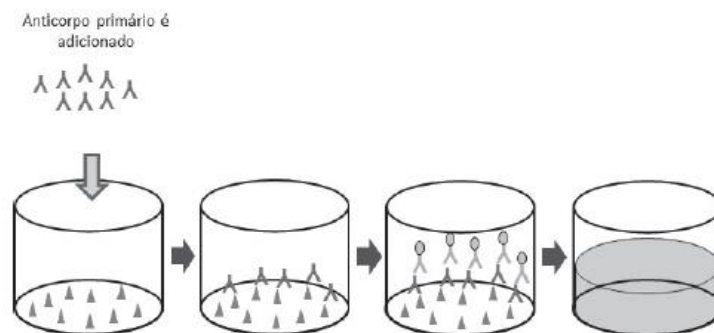
4. Tipos de Imunoensaio

Os ensaios imunoenzimáticos ELISA, do acrônimo *enzymelinkedimmunosorbentassay*, têm sido amplamente utilizados para a detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas e baseiam-se na conjugação do antígeno ou do anticorpo com uma enzima. Nos ensaios em que se utilizam dois anticorpos, o anticorpo não marcado que se liga ao antígeno é denominado anticorpo primário, enquanto o anticorpo marcado com enzima que se liga ao anticorpo primário é denominado anticorpo secundário. Os principais tipos de ELISAs são o indireto, o competitivo direto (dc-ELISA), o competitivo indireto (ic-ELISA) e o ELISA sanduíche (ONO, et al, 2016).

4.1 ELISA indireto

O ELISA indireto envolve os antígenos imobilizados ligados à microplaca e dois anticorpos, sendo um adicionado numa solução de anticorpo primário específico que reconhece o antígeno (este anticorpo não possui enzima ligada a ele). Os anticorpos em excesso ou não ligados que permanecem no poço são então lavados pelo passo de lavagem, seguido por adição de anticorpo secundário enzima-conjugado à placa para detectar os complexos antígeno-anticorpo ligados nos poços. A cor é desenvolvida quando o substrato da enzima é adicionado. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração dos antígenos presentes na amostra da solução (HIPOLITO, 2017).

Figura 03 - ELISA indireto.



O anticorpo é adicionado à placa contendo antígeno imobilizado. Ao adicionar o anticorpo secundário marcado com enzima e posteriormente o substrato, a coloração desenvolvida será proporcional à ligação do anticorpo primário ao antígeno (ONO, et al, 2016).

5. OBJETIVOS

Capítulo 1

5.1 Geral

- Otimizar a técnica do imunoenensaio ELISA indireto (i-ELISA), visando o aproveitamento de materiais utilizado em pesquisas anteriores armazenados no laboratório.

5.2 Específicos

- Selecionar a melhor concentração de anticorpo primário e secundário;
- Testar o melhor procedimento para pipetagem e de lavagem de microplaca;
- Determinar o tempo de estabilidade de conjugado OTA-BSA;

Capítulo 2

5.3 Geral

- Comparar o efeito e diferenças na via de contaminação de OTA em pintainho submetido a ingestão de ração contaminada versus inoculação subcutânea no parâmetro hematológico em pintainho.

5.4 Específicos

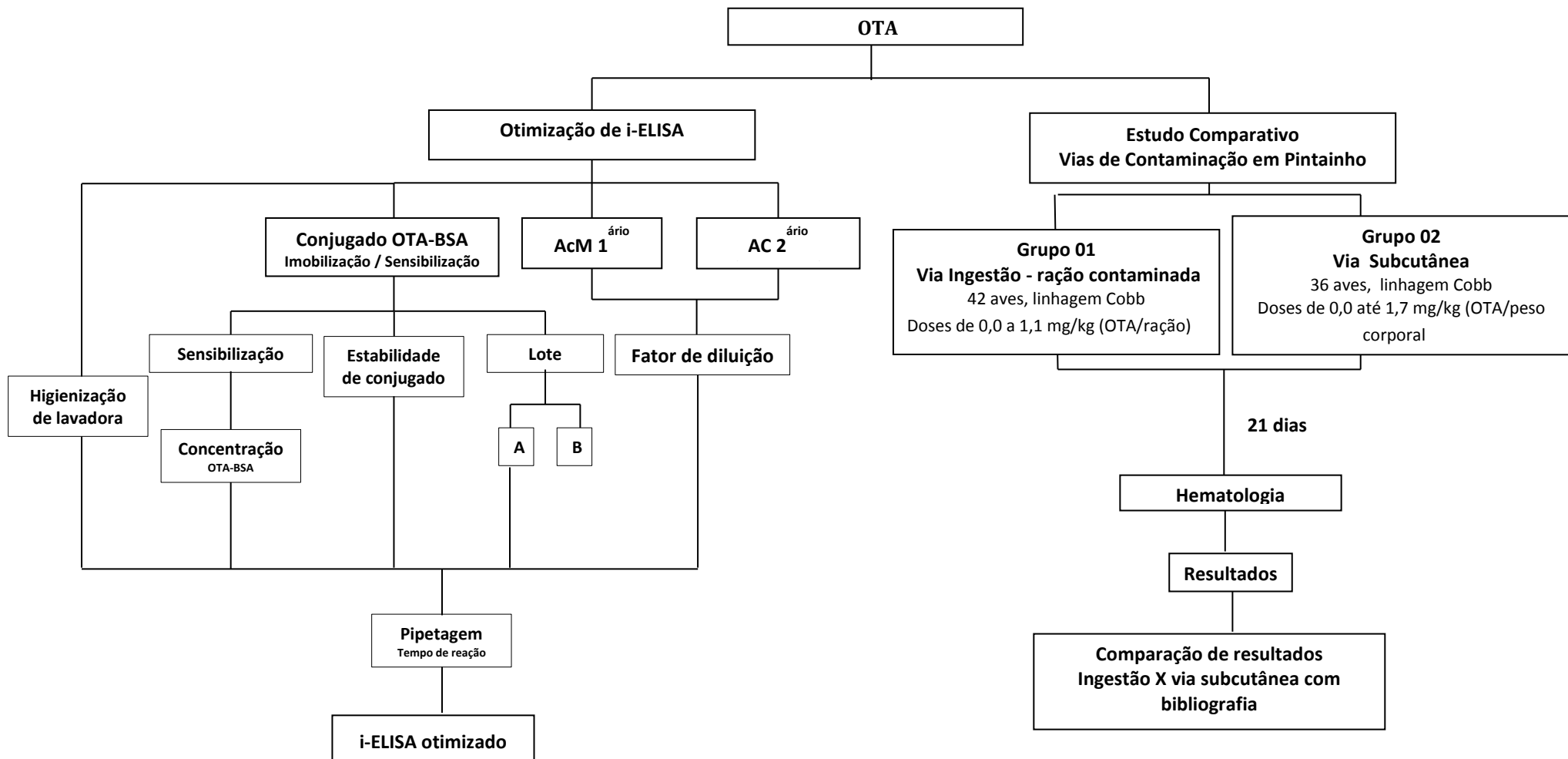
- Dividir os pintainhos em dois grupos e proceder ensaio de exposição oral através da ingestão de ração contaminada com OTA e, outro grupo sob injeção subcutânea de OTA.
- Analisar efeito perante parâmetro hematológico.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Fluxograma Experimental

A figura 07 apresenta o esquema geral da dissertação, que consistiu de otimização da análise de OTA por i-ELISA e comparação entre contaminação via ingestão versus subcutânea em pintainho.

Figura 04. Fluxograma geral - OTA: otimização de i-ELISA e comparação entre vias de inoculação (oral e subcutânea) e diferentes doses de contaminação em pintainho.



7. CAPÍTULO I

OCRATOXINA A (OTA): I-ELISA COMO FERRAMENTA AVALIADORA NA OTIMIZAÇÃO DE IMUNOENSAIO

7.1. MATERIAIS

- Microplaca Costar® 3590 Corning Incorporated, Corning, NY 14831, EUA.
- Conjugado OTA-BSA, preparado por Silva (2010).
- Anticorpo AcM anti-OTA produzido por hibridoma linhagem OTA.1 secretora de anticorpo monoclonal (AcM - isotipo IgG₁ kappa) contra OTA, sendo derivado de mieloma linhagem Sp2/0-Ag14 e célula esplênica de camundongo BALB/c (Kawamura *et al.*, 1989). O AcM anti-OTA utilizado apresentou atividade cruzada com OTC (63.1%), OTB (0.63%), OTa (0.06%) e 4-hidroxi-OTA (1.19%), sendo cultivado por Ishikawa (2012).
- Anticorpo secundário anti-IgG ligado a HRP (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA);
- 3,3',5,5'-tretametilbenzidina (TMB- Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA).
- Peróxido de hidrogênio 30 % (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Albumina de soro bovino (BSA – Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA).
- Tampão carbonato-bicarbonato 0,1 mol L⁻¹ pH 9,6.
- Tampão fostato salina (PBS) 0,015 mol L⁻¹ pH 7,3.
- PBST (Tampão fostato salina (PBS) 0,015 mol L⁻¹ pH 7,3 com Tween 20 a 0,05%)
- Leitora de placa de imunoensaio Anthos Zeneth 200rt (Anthos-Labtec, Cambridge, UK).
- Lavadora de microplaca de imunoensaio Bras Serum Model RSII.

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico.

- Filtro PURELAB® OPTION Q7 (ELGA, Lane End, High Wycombe, UK).
- Filtro PERMUTION® RO/0510 (Curitiba, Paraná, Brasil).
- Microsoft Excel 2010.

7.2.METODOLOGIA

7.2.1 Parâmetros considerados para otimização de i-ELISA para análise de OTA

A concentração ótima de conjugado OTA-BSA, anticorpo primário AcMAnti-OTA e anticorpo secundário *Anti-mouse*IgG-peroxidase foi determinada, tendo como base de parâmetro inicial as concentrações apresentadas por ISHIKAWA (2012), conforme Tabela 04.

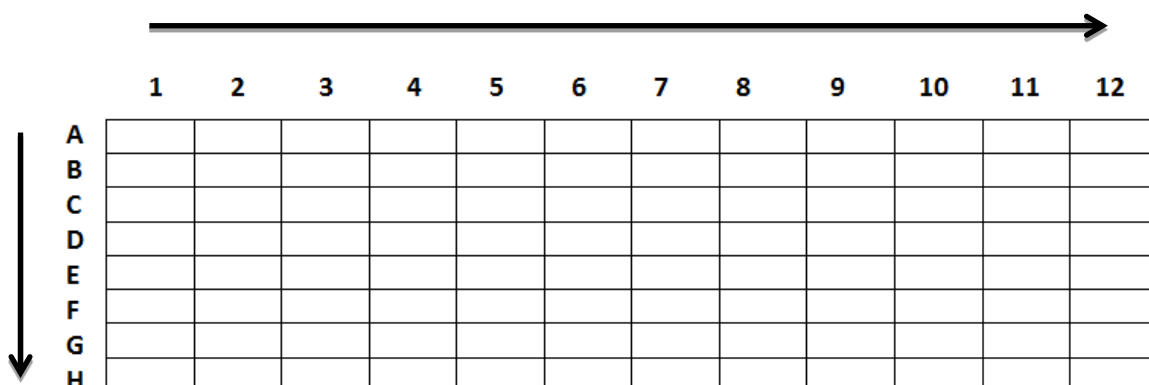
Tabela 05. Parâmetros testados na otimização de concentração e diluição de reagentes básicos para o ensaio i-ELISA.

| Conjugado OTA-BSA (ng/ml) | Anticorpo (Diluição) | |
|------------------------------|--|---------------------------|
| | AcMAnti-OTA | Anti-mouseIgG-peroxidase |
| 50; 100 | 1/1; 1/10; 1/100; 1/200; 1/300; 1/400; 1/500; 1/1.000; 1/2.000; 1:5.000; 1/10.000; 1/100.000; 1/1.000.000 | 1/2.000; 1/4.000; 1/6.000 |

7.2.2 Efeito da direção de pipetagem no tempo de reação

A sequência de pipetagem clássica manual com micropipeta simples na rotina consistiu de início na linha A da microplaca (coluna 1 a 12), procedendo o mesmo para linha B até concluir a linha H (Figura 08).

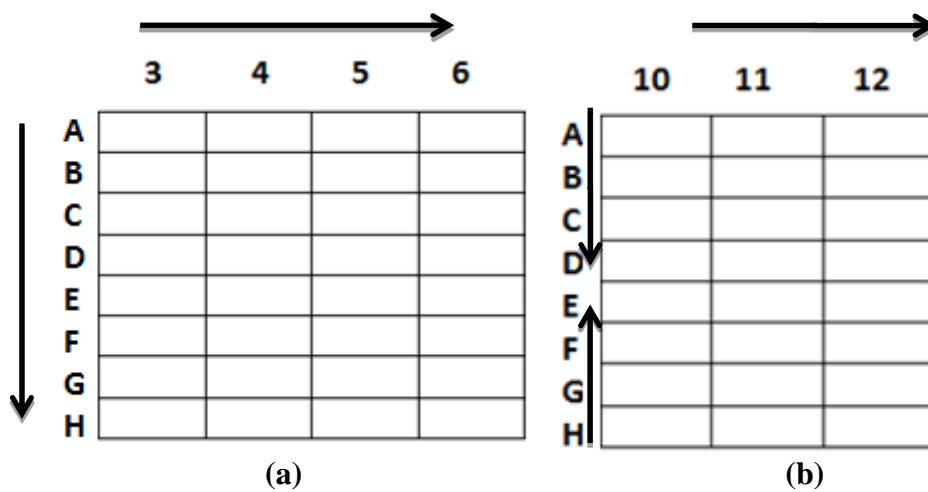
Figura 05. Esquema de pipetagem de rotina em microplaca.



O teste comparativo referente ao efeito da direção de pipetagem consistiu de pipetagem clássica na rotina, i.e. iniciar na linha A (coluna 3 para 6), procedendo o mesmo até a linha H (sentido descendente), conforme apresentado na Figura 09 - A.

Em outra microplaca procedeu-se o teste similar, porém alternado o sentido descendente e ascendente, visando testar o tempo de reação do primeiro ao último micropoço receber os reagentes (Figura 09 - B). I.e., pipetagem em sequência de linha A, H, B, G, C, F, D, e E. Assim, no sentido descendente, iniciou-se na linha A (coluna 10, 11, 12); seguiu-se para sentido ascendente, linha H (coluna 10, 11, 12); descendente, linha B; ascendente, linha G até finalização da placa. Os brancos consistiram de dois poços da coluna 12 na Linha D e E.

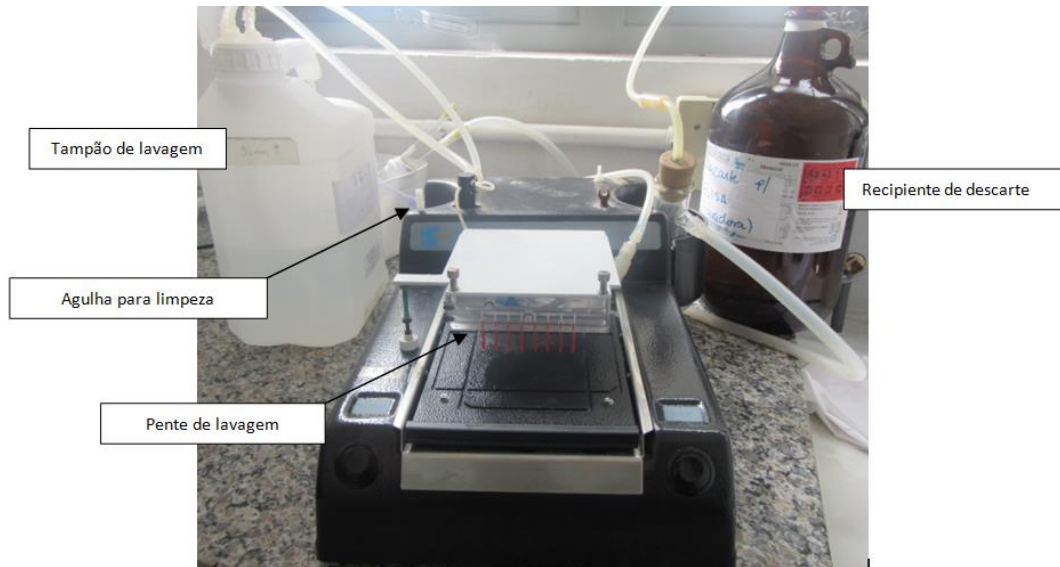
Figura 06 - Teste comparando tempo de pipetagem na rotina (a) versus microplaca teste(b).



7.2.3 Higienização (limpeza) da lavadora de microplaca

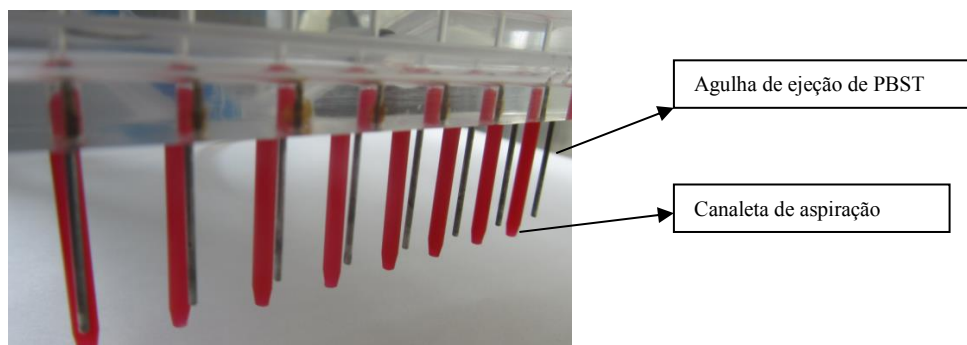
O teste da higienização da lavadora de microplaca (BrasSerumModel RSII, Figura 10) consistiu em limpeza de pente (suporte para agulha e canaleta em formato de pente) para sistema de ejeção e aspiração do tampão de lavagem (Figura 11).

Figura 07. Lavadora de microplaca e seus componentes.



A limpeza mecânica das canaletas de aspiração foi realizada com agulha para limpeza (Figura 11), seguida de sonicação por 20 min, sendo a sequência: água com detergente; água destilada; 2,0 mL de ácido sulfúrico 1M diluído em 400 mL de água; água destilada; água ultrapura, antes da primeira etapa de lavagem de microplaca na reação de imunoenensaio. A frequência recomendada para a lavagem é 1 vez por semana, antes de se iniciar a série de análises.

Figura08. Pente de lavagem: suporte para agulha de ejeção de PBST e canaleta para aspiração em formato de pente em lavadora de microplaca.



A avaliação da efetividade de limpeza consistiu em leitura em espectrofotômetro procedendo i-ELISA. Com esta finalidade, a lavagem de microplaca em reação foi realizada com a lavadora na etapa de pré-higienização em comparação ao equipamento pós-higienizado.

7.2.4 Estabilidade de conjugado OTA-BSA

Considerando que o conjugado OTA-BSA estoque-uso seja o único reagente mantido em solução a 4°C para a realização do i-ELISA, este consistiu o alvo do teste. Referente a outros reagentes essenciais, seja AcManti-OTA como Ac secundário anti-*mouse*, aliquotados, foram mantidos a -20°C e, diluídos no momento do uso. O experimento começou com a utilização de conjugado produzido por SILVA (2010) e conjugado gentilmente cedido pelo Professor Doutor Kawamura em 2017.

O teste de estabilidade de conjugado OTA-BSA diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 mol L⁻¹ pH 9,6 (solução estoque-uso) a 4 °C consistiu em análise de tempo capaz de manter a leitura de i-ELISA em valor estável. Com esta finalidade, o conjugado OTA-BSA estoque-armazenado a -20°C (1,686 mg/mL) foi diluído para 1000 ng/mL em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 mol L⁻¹ pH 9,6) para estoque-uso. No momento da sensibilização da microplaca, a solução foi diluída para 100 ng/mL em PBS e, 100 µL introduzido em cada poço (10 ng de OTA). A seguir, procedeu-se i-ELISA em triplicata, sendo a leitura foi realizada durante 36 dias.

7.2.5 Comparação entre dois lotes de conjugados OTA-BSA

A comparação de dois lotes de conjugado OTA-BSA, um que já havia no laboratório produzido por SILVA (2010) e outro gentilmente cedido pelo Professor Osamu Kawamura em setembro de 2017, foi realizada a fim de se avaliar qual dos lotes daria melhor resposta ao imunoenensaio.

8.RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Parâmetros considerados para otimização de i-ELISA para análise de OTA

A concentração de OTA-BSA/mL selecionada foi de 100ng; a diluição de AcManti-OTA selecionada foi de 1/100 e de *Anti-mouse*IgG-peroxidase de 1/4.000, considerando que sob este parâmetro, o ensaio preliminar apresentou a média de absorvância a 450 nm de 0,845 (dados não-apresentados). As demais concentrações apresentaram baixa leitura, leitura excessivamente alta, ou por necessitar maior quantidade de reagente e obtendo resultados similares ao parâmetro selecionado.

8.2 Efeito da direção de pipetagem no tempo de reação

A seguir, testes foram realizados para otimizar o imunoenensaio i-ELISA perante procedimento de pipetagem (sequência) influenciando no tempo de reação, higienização da lavadora de microplaca, comparação entre lotes de conjugado OTA-BSA .

A Tabela 05 apresenta o resultado com o procedimento clássico empregado no protocolo de rotina para a análise por i-ELISA. A absorvância a 450 nm consistiu em comparar a diferença na leitura entre a primeira e última linha a receber os reagentes para análise por i-ELISA, visando avaliar o efeito no lapso em tempo de reação oriunda de pipetagem. A linha A mostra a leitura de branco (sem AcManti-OTA), enquanto que a linha B a H apresenta replicatas com os mesmos volumes de todos os reagentes para i-ELISA.

Tabela 06. Resultado de leitura de i-ELISA empregando o procedimento clássico de pipetagem.

| Linha/Col. | Absorvância (450 nm) | | | | Avaliação | | |
|------------|----------------------|--------------|-------|-------|---------------|--------|----------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| A | 0,010 | 0,008 | - | - | | | |
| B | 0,816 | 0,796 | 0,784 | 0,758 | Média | | |
| C | 0,802 | 0,775 | 0,745 | 0,421 | Branco | 0,009 | 0,001414 |
| D | 0,652 | 0,674 | 0,669 | 0,662 | Reação | 0,6775 | 0,088674 |
| E | 0,700 | 0,679 | 0,713 | 0,588 | | | 16% |
| F | 0,704 | 0,673 | 0,586 | 0,599 | | | |
| G | 0,737 | 0,665 | 0,647 | 0,532 | | | |
| H | 0,707 | 0,682 | 0,632 | 0,572 | | | |

Linha A: branco.

Linhas B a H: Reação.

O tempo de incubação devido a diferença na pipetagem afetou a leitura, observando-se maior leitura na linha B (maior tempo de reação), seguida de queda gradativa no valor até a finalização da pipetagem na linha H (menor tempo de reação), sugerindo a importância de injeção simultânea de cada reagente nestes 28 poços, para assegurar os resultados confiáveis ao nível de ng.

A seguir, a Tabela 06 mostra a mesma modalidade de avaliação, porém procedendo alterações na direção de pipetagem, i.e. alternando pipetagem na sequência descendente *versus* descendente em sequência alternada (Figura 09). Neste teste, o branco foi último a ser pipetado, seja em direção descendente como ascendente.

Tabela 07. Resultado de leitura com sequenciamento alternado.

| Linha/Col. | Absorvância (450 nm) | | | Avaliação | | | |
|------------|----------------------|-------|--------------|---------------|--------------|-------------|------------|
| | 10 | 11 | 12 | | | | |
| A | 1,150 | 0,911 | 0,641 | | Média | D.P. | C.V |
| B | 1,327 | 0,992 | 0,751 | Branco | 0,011 | 0,0007 | 6% |
| C | 0,962 | 0,807 | 0,682 | Reação | 0,871 | 0,3134 | 35% |
| D | 0,908 | 0,813 | 0,011 | | | | |
| E | 0,909 | - | 0,012 | | | | |
| F | 0,957 | 0,762 | 0,541 | | | | |
| G | 0,957 | 0,846 | 0,598 | | | | |
| H | 1,282 | 0,889 | 0,619 | | | | |

*Poços D12 2 E12: brancos. Demais poços: reação.

A Tabela 06 mostra menor leitura na linha F (últimos poços a receber os reagentes). A diferença na leitura de primeira e última linha a receber os reagentes continuou ocorrendo; todavia, o coeficiente de variação (C.V.) aumentou, em se tratando de direção em que o técnico não estava acostumado, passando de 13 para 16% na leitura de branco (sem a presença de anticorpo primário AcManti-OTA) e de 8 para 33% nos poços com todos os reagentes. Este resultado mostra que a habilidade técnica já condicionada na rotina clássica (Tabela 05), em relação à mudança de procedimento técnico pode afetar a qualidade analítica, indicando o treinamento técnico seja essencial para análise confiável.

A análise estatística apresentada na Tabela 06 ratificou a diferença na leitura entre procedimento clássico de rotina (Tabela 05) em relação ao procedimento alterado perante direção da pipetagem ($P < 0,05$). Portanto, o melhor procedimento de pipetagem consistiu em seguir a sequência empregada na rotina.

Tabela 08. Avaliação estatística das médias de leitura de microplacas - pipetagem clássica *versus* pipetagem com sequenciamento alternado.

| Teste-F: duas amostras para variâncias | | |
|---|-------------|----------|
| Variável | 1 | 2 |
| Média | 0,6775 | 0,872 |
| Variância | 0,0079 | 0,0434 |
| Observações | 28 | 21 |
| gl | 27 | 20 |
| F | 0,181371332 | |
| P(F<=f) uni-caudal | 3,05851E-05 | |
| F crítico uni-caudal | 0,506690749 | |

P<0,05 – indica diferença significativa nas modalidades de pipetagem testadas.

Variável 1: pipetagem clássica empregada na rotina.

Variável 2: pipetagem com sequenciamento alternado

Além de procedimento na sequência de pipetagem afetar a homogeneidade da leitura, deve-se considerar a manutenção dos equipamentos indispensáveis de apoio, a exemplo de lavadora de microplaca, testado no próximo tópico.

8.3 Higienização (limpeza) da lavadora de microplaca

A leitura de microplaca em espectrofotômetro mostraram diferenças entre as leituras de linhas B em relação à linha H, já que a linha A é onde era realizado o teste branco para garantir a eficácia do imunoenensaio i-ELISA.

Leituras de primeira e última linha de placas de imunoenensaio apresentaram muita diferença na mesma placa e em mesma condição. A persistência do problema levou a suspeitar da lavadora de placas de imunoenensaio e uma higienização da lavadora foi feita como já descrito. Durante a higienização, foram encontrados cristais de sais na lavadora e todo o material que pudesse interferir no processo de lavagem de placa foi removido. Antes da higienização, o C.V. chegou a ser de 37% na mesma placa e foi reduzido para até 5%.

8.4 Estabilidade de conjugado OTA-BSA

No decorrer da repetição de ensaio i-ELISA, observou-se problema na repetitividade com queda nos resultados obtidos, indicando instabilidade de reagente utilizado. A média de leitura em absorvância de 450 nm iniciou em 0,845, caiu para 0,377 e reduziu até 0,035 nas condições descritas no tópico 8.1.

Para investigar possível causa de queda na leitura, um novo estoque-uso de conjugado OTA-BSA foi preparado na concentração de 1000 ng/ml em tampão carbonato-bicarbonato (t_0) e, mantido a 4°C, sendo esta a matriz utilizado para o preparo de solução para a reação. O i-ELISA foi realizado sempre nas mesmas condições em dias diferentes, sendo a diluição de reagentes principais executada no momento do uso (OTA-BSA estoque-uso diluído em PBS; AcManti-OTA em PBS; Ac secundário anti-*mouse* em PBST).

A Tabela 08 mostra o resultado de leituras obtidas e as datas correspondentes ao ensaio i-ELISA no período de 36 dias, sob as mesmas condições de ensaio.

Tabela 09. Tempo em dias de conjugado em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1 mol L⁻¹pH 9,6 e respectiva leitura.

| Tempo (dias) | Absorvância (450 nm) | | |
|-----------------|----------------------|-------|------|
| | Faixa de leitura | média | C.V. |
| t ₀₁ | 1,275 – 1,917 | 1,542 | 8% |
| t ₀₅ | 1,403 – 0,804 | 1,096 | 11% |
| t ₁₂ | 0,619 – 1,665 | 0,995 | 33% |
| t ₁₉ | 0,723 – 0,449 | 0,573 | 14% |
| t ₃₂ | 0,423 – 0,525 | 0,431 | 10% |
| t ₃₆ | 0,298 – 0,412 | 0,329 | 14% |

O teste de estabilidade no decorrer de 36 dias (t_0 a $t_{36\text{dias}}$) indicou queda gradativa na leitura em absorvância a 450 nm de 1,542 para 0,329 (Tabela 08). O fato apontou provável problema na estabilidade de conjugado OTA-BSA, já que o AcManti-OTA e Ac secundário anti-*mouse* mantido a -20 somente tenha sido diluído em PBS e PBST, respectivamente, no momento do ensaio. Em contraste, a solução estoque-uso de conjugado OTA-BSA esteve mantido nestes 36 dias em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 mol L⁻¹pH 9,6 a 4 °C, portanto não congelado em solução alcalina e diluído para 100 ng/mL em PBS no momento de cada reação. O conjugado se manteve estável suficiente para realização de imunoenaios em t_{01} até o t_{12} (Tabela 08), sendo esse o tempo de utilidade deste conjugado OTA-BSA em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 a 4°C, se não consideramos a rigidez quantitativa do resultado.

Assim, sugere-se ocorrência da perda de atividade de OTA-BSA na etapa de manutenção de estoque-uso não-congelado em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 a 4 °C, aliado a condições do refrigerador e outros reagentes mantidos juntos no mesmo local.

Embora o tampão carbonato-bicarbonato seja diluente de escolha no preparo de conjugado OTA-BSA para sensibilização (ABRUNHOSA, L. & VENÂNCIO, A. 2007, FUJII, S. et al., 2007, ZHANG, A. et al. 2011.), os dados apresentados neste trabalho

questionaram se este seria o diluente ideal. I.e., a alcalinidade (pH de 9,6) poderia afetar a conformação proteica de BSA, contribuindo para a baixa durabilidade do reagente, alertando para os cuidados necessários na manutenção de um reagente proteico.

Aliado a este fator, fator adicional que também pode ter contribuído para a baixa durabilidade do reagente OTA-BSA estoque-uso seria a manutenção juntamente com os extratos de analitos (bioativos, micotoxinas, cianotoxinas) em solventes orgânicos voláteis para análise por UPLC-MSMS. A saber, diferente de proteínas, estes analitos de baixa massa molecular conseguiriam manter a conformação química inalterada sob condição de solventes extratores drásticos. AQEEL, Z., BLOOD, N. & TUNER, J. (2018) armazenando metanol por 10 dias, observaram perda em massa de 0,007% de metanol em frasco completamente fechado, enquanto em frasco aberto ocorreu perda de até 27,8%, com variação dependente do tipo de vedação. Ou seja, a perda devido a volatilização pode interferir na característica de outros reagentes mantidos no mesmo local, causando queda em sua efetividade.

Consequentemente, os reagentes biológicos essenciais (OTA-BSA, Ac primário AcManti-OTA, Ac secundário anti-*mouse*) e microplaca-reação de imunoenensaio ELISA sensibilizada mantidos juntos em ambiente com solventes orgânicos voláteis utilizados nos extratos de amostra para análise por espectrometria devem ter causado danos irreparáveis em estrutura proteica tridimensional. Solventes de alta toxicidade volatilizados em ambiente fechado (refrigerador) penetrariam também em recipientes com reagentes proteicos destinados ao ensaio ELISA, alterando a funcionalidade real.

A especificidade e sensibilidade extremamente elevada oriunda de estrutura terciária e quaternária de proteína, aliado ao uso de solventes baseados em água (tampão) de menor toxicidade em vez de solvente orgânico trata-se de fator excepcional na analítica e proteção aos profissionais técnicos, assim como uso de equipamentos simples. Em contraste, esta flexibilidade tem sido maior motivo na dificuldade de automação de reagente biológico proteico, sujeito à desnaturação e, conseqüente invalidez perante aplicação analítica de precisão.

Retifica-se a hipótese sobre efeito de solventes volatilizados na inativação de reagentes protéicos, já que além de todas as etapas testadas, entre os últimos ensaios também avaliou-se a qualidade de água, comparando a água utilizada rotineiramente no Laboratório LIM (Equipamento ELGA., modelo OPTION Q7), em relação a água ultrapura do Laboratório LABSAN – equipamento Permutation, modelo RO/0510. Salienta-se a utilização da referida água ultrapura para o cultivo de *Daphnia magna*, *Ceriodaphniadubia* e *Pseudokirchneriellasubcapitata*, destinado à avaliação ecotoxicológica empregando

organismos testes bastante sensíveis a xenobióticos (dados não apresentados). Os resultados obtidos mostraram-se todos negativos – leitura de absorvância a 450 nm próximo a 0,050 (equivalente ao branco da reação), apontando novamente, o problema com a desnaturação de reagentes imunológicos (dados não-apresentados).

Em suma, a Tabela 08 sugere que o tempo máximo de validade aceitável de conjugado OTA-BSA em tampão bicarbonato-carbonato pH 9,6 (estoque-uso) seja de aproximadamente de até 12 dias (Tabela 08, com os valores de absorvância de 1,542 (t_1); 1,096(t_5); 0,995(t_{12})), devendo-se manter os reagentes biológicos essenciais para o imunoenensaio ELISA em ambiente isento de solventes orgânicos. Sugere-se também uma avaliação substituindo tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 com tampão PBS, para testar a durabilidade de OTA-BSA estoque-uso à 4°C.

Neste trabalho o AcManti-OTA utilizado foi produzido por Ishikawa (2012). Salienta-se perda na atividade de AcManti-OTA armazenado a -20°C em laboratório sem gerador de energia pelo período de 6 anos, sugerindo recorrente queda de energia elétrica no estabelecimento. Considerando que AcM seja molécula biológica de massa molecular elevada, i.e. proteína com quatro cadeias (duas L – leves e duas H – pesadas), a conformação tridimensional, altamente sensível, justificaria os resultados obtidos. Assim sendo, o anticorpo produzido deve ser mantido a -87°C e, o equipamento com fornecimento de energia contínuo através de gerador de energia. A nossa condição atual de instalação não atende este requisito. Não obstante, o freezer -87°C está acoplado ao cilindro de CO₂, capaz de injetar em caso de subida de temperatura sob queda de energia, mas o sistema se ativa quando a temperatura atinge -55°C, equivalente a aproximadamente 32°C de diferença. Sugere-se reduzir a temperatura para indução de descarga de CO₂, assim como instalar o equipamento em local abastecido com gerador de energia.

8.5 Comparação entre dois lotes de conjugados de OTA-BSA

A comparação entre 2 lotes de conjugado OTA-BSA foi feita procedendo diluição 1:100 de AcM Anti-OTA, para se avaliar qual apresentaria a melhor resposta. Foram comparados o lote A (preparado por Silva (2010) e o lote B cedido gentilmente por Kawamura em Setembro de 2017. O resultado de teste está na tabela 09.

Tabela10. Efetividade de conjugado OTA-BSA.

| Linha/Col. | Absorvância (450 nm) | | | | | |
|------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | Lote A | | | Lote B | | |
| | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | - | 0,053 | 0,055 | - | 0,047 | 0,066 |
| B | 1,921 | 2,099 | 2,021 | 1,859 | 1,803 | 1,504 |
| C | 1,821 | 1,875 | 1,608 | 1,062 | 1,118 | 1,107 |
| D | 1,727 | 1,776 | 1,610 | 1,119 | 1,064 | 1,043 |
| E | 1,800 | 1,718 | - | 1,155 | 1,014 | 0,934 |
| F | 1,489 | 1,573 | 1,590 | 1,030 | 0,981 | 0,861 |
| G | 1,469 | 1,459 | 1,409 | 0,920 | 0,971 | - |
| H | 1,297 | 1,477 | 1,418 | 0,972 | 0,949 | 1,374 |
| | | Branco | Reação | Branco | Reação | |
| | Média | 0,054 | 1,657 | 0,056 | 1,142 | |
| | D.P. | 0,0014 | 0,2194 | 0,0134 | 0,2793 | |
| | C.V. | 3% | 13% | 24% | 24% | |

Linha A: branco. Demais linhas: reação.

O lote A apresentou maior leitura em absorvância (média, 1,595) em relação ao lote B (média, 1,142), com diferença significativa sob as mesmas condições de ensaio ($p < 0,05$) (Tabela 09).

Tabela 11: Comparação estatística dos dois lotes de conjugado ($p < 0,05$). Teste – T.

| Teste-T: duas amostras presumindo variâncias equivalentes | | |
|---|----------|----------|
| | Lote A | Lote B |
| Média | 1,65785 | 1,142 |
| Variância | 0,048144 | 0,078022 |
| Observações | 20 | 20 |
| Variância agrupada | 0,063083 | |
| Hipótese da diferença de média | 0 | |
| gl | 38 | |
| Stat t | -6,49482 | |
| P(T<=t) uni-caudal | 5,98E-08 | |
| t crítico uni-caudal | 1,685954 | |
| P(T<=t) bi-caudal | 1,2E-07 | |
| t crítico bi-caudal | 2,024394 | |

Outrossim, questiona-se a real validade desta diferença significativa entre os lotes, se observarmos o resultado de manutenção / higienização (limpeza) da lavadora de microplaca (Tópico 8.3). A Figura 11 mostra oxidação / ferrugem principalmente no ponto de inserção da agulha de ejeção de PBST no suporte acrílico de pente. Isso pode ter afetado a intensidade de ejeção de tampão durante a lavagem da microplaca e conseqüentemente, o resultado. Além

disso, deve-se considerar o tempo de utilidade deste equipamento, já que se tratava de peça antiga sem reposição no mercado.

Finalizada a escolha de lote de OTA-BSA (lote A), prosseguiu-se a otimização de i-ELISA, testando as diluições de AcM anti-OTA.

No experimento preliminar, testou-se a diluição de AcM anti-OTA 1/100 a 1/500 (Ac primário), fixando a diluição de anti-igG HRP anti-mouse (Ac secundário) em 1/4000, para avaliar se a leitura atenderia a exigência da lei de Lambert-Beer, i.e. capaz de obter absorvância dentro da faixa de 0,2 a 0,8 (SKOOG; WEST; HOLLER, 1992). Considerando a elevada absorvância obtida (dados não apresentados), aumentou-se a diluição a ser testada para a faixa entre 1/1000 a 1/10.000 (Tabela 10).

A Tabela 10 apresenta os resultados da melhor diluição de AcM anti-OTA i-ELISA, considerando que outros parâmetros já tenham sido determinadas: higienização (limpeza) da lavadora de microplaca; estabilidade de conjugado OTA-BSA; Comparação entre os lotes de conjugado OTA-BSA.

A melhor diluição escolhida de 1/5.000 apresentou o valor médio de absorvância de 0,683, estando dentro dos valores ideais de absorvância entre 0,2 e 0,8, i.e. evitaria os desvios na Lei de Lambert-Beer (SKOOG; WEST; HOLLER, 1992), além de reduzir a quantidade de reagente e, minimizar o custo da análise. Embora a diluição 1/10.000 (média de leitura, 0,379) também esteja dentro da exigência de Lambert-Beer, escolheu-se 1/5.000 (média, 0,683) como diluição de escolha, para evitar eventuais problemas com queda na leitura de absorvância no decorrer da utilização de AcM estoque a 4° C (diluído na data do ensaio).

Além destas etapas referente a OTA-BSA, em nosso trabalho procedeu-se etapas adicionais de otimização (Otimização da análise de OTA por i-ELISA; Higienização (limpeza) da lavadora de microplaca; Estabilidade de conjugado OTA-BSA; Comparação entre dois lotes de conjugados OTA-BSA). Os parâmetros utilizados foram estabelecidos por KAWAMURA et al., (1989), adequadas ao nosso laboratório por ISHIKAWA (2012). Os pontos que necessitaram de otimização nesse trabalho também envolveram tempo de estocagem de reagentes e condições dos equipamentos, conforme anteriormente descritos.

Tabela 12: Determinação da diluição de AcManti-OTA para análise de OTA por i-ELISA.

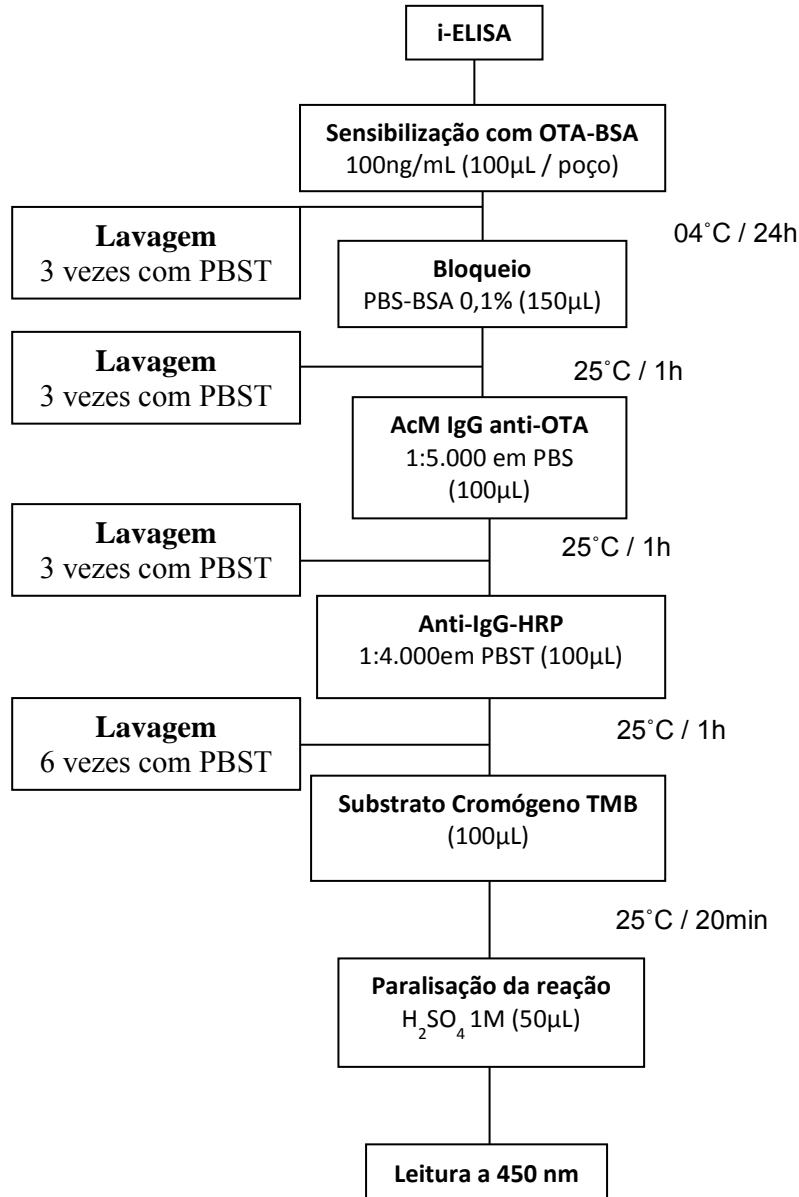
| Microplaca Linha/Coluna | AcManti-OTA (Diluição) | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|------------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| | 1/1.000 | | | 1/2.000 | | | 1/5.000 | | | 1/10.000 | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 2,164 | 2,263 | 2,223 | 1,890 | 1,875 | 1,763 | 1,052 | 0,841 | 0,756 | 0,398 | 0,571 | 0,505 |
| B | 1,906 | 2,066 | 1,857 | 1,418 | 1,259 | 1,514 | 0,955 | 0,987 | 0,866 | 0,488 | 0,554 | 0,397 |
| C | 1,946 | 1,464 | 1,621 | 1,487 | 1,193 | 1,287 | 0,818 | 0,661 | 0,698 | 0,374 | 0,375 | 0,405 |
| D | 1,617 | 1,748 | 1,541 | 1,373 | 1,450 | 1,376 | 0,626 | 0,854 | 0,795 | 0,366 | 0,330 | 0,309 |
| E | 1,409 | 1,252 | 1,278 | 1,056 | 1,209 | 1,013 | 0,59 | 0,619 | 0,569 | 0,302 | 0,297 | 0,308 |
| F | 1,283 | 1,205 | 1,216 | 0,998 | 0,953 | 0,948 | 0,556 | 0,555 | 0,568 | 0,282 | 0,289 | 0,282 |
| G | 1,164 | 1,560 | 1,148 | 0,919 | 0,927 | 0,878 | 0,527 | 0,527 | 0,518 | 0,269 | 0,269 | 0,270 |
| H(Branco) | 0,054 | 0,050 | 0,053 | 0,051 | 0,051 | 0,056 | 0,050 | 0,050 | - | 0,059 | 0,066 | - |
| | | Branco | Reação | | Branco | Reação | | Branco | Reação | | Branco | Reação |
| Média | | 0,052 | 1,616 | | 0,053 | 1,275 | | 0,050 | 0,683 | | 0,062 | 0,379 |
| D.P. | | 0,002 | 0,370 | | 0,003 | 0,313 | | - | 0,167 | | 0,005 | 0,095 |
| C.V. | | 4% | 23% | | 5% | 25% | | - | 25% | | 8% | 25% |

* Negrito: branco da reação.

- : Sem variação.

O i-ELISA otimizado, utilizando conjugado OTA-BSA lote A para a sensibilização de microplaca segue o esquema a seguir.

Figura 12 – Esquema de etapas de i-ELISA otimizado.



9. DISCUSSÃO

O i-ELISA deste trabalho iniciou-se com teste preliminar empregando: sensibilização da microplaca com 100 μL de OTA-BSA a 100ng/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 mol L^{-1} pH 9,6; bloqueio com 150 μL de BSA a 0,1% em PBS; AcManti-OTA 1/100 (v/v) em PBS; Ac secundário Anti-IgG HRP 1/4.000 (v/v) em PBST. Os subsequentes ensaios de otimização determinaram diluição de AcManti-OTA para 1/5.000 (v/v), salientando-se aumento em 50 vezes na sensibilidade, melhorando rendimento de reagente e diminuindo o custo da técnica.

NEMZEK, J.A., SIDDIQUI, J., REMICK, D. G. 2001 testou agentes bloqueadores BlockerTM BLOTTO em TBS (Pierce, Rockford, IL.), BlockerTMCasein em PBS (Pierce), Superblock® Blocking Buffer em PBS (Pierce) e plasma de indivíduo saudável para o bloqueio da microplaca após sensibilização para otimização do imunoenensaio ELISA. Este estudo não foi conclusivo, pois o agente bloqueador variou conforme o analito, sugerindo novas pesquisas para determinar qual o melhor agente bloqueador. Em nosso trabalho, BSA mostrou ser eficiente como bloqueador de placa para imunoenensaio.

KADIR, M.K.A. & TOTHIL, I. E., 2013 testou tampão carbonato (a 0,1 M e pH 9.6) e tampão PBS (a 0,01 M pH 7,4) como diluente de conjugado AFB₁.BSA para ELISA competitivo indireto e concluiu que o tampão carbonato fosse o de eleição por haver evidências de que com o pH maior, a adsorção do conjugado na placa seja mais efetiva. LÚCIO, C. H., PINTO, N. F. J., MARRIEL, I. E. (2007), desenvolveram um i-ELISA para quantificação de aflatoxina B₁ sendo anticorpo monoclonal anti-AFB₁ adquirido de Sigma em EMBRAPA Milho & sorgo em Sete Lagoas – MG. Os autores otimizaram o i-ELISA para anticorpo primário (1:5.000) e Anti-IgG HRP (1:3.000).

Em comparação, o i-ELISA desenvolvido apresentou a mesma diluição de anticorpo primário (1:5.000), mas maior diluição de anticorpo secundário Anti-IgG HRP (1:4.000). I.e., o i-ELISA otimizado nesse trabalho utilizando anticorpo secundário em maior diluição reduz o custo do imunoenensaio; além disso, a capacidade em produzir AcManti-OTA *in loco* em nosso laboratório resulta em redução drástica de custo.

10. CONCLUSÃO

O trabalho obteve sucesso na otimização de i-ELISA. O anticorpo primário AcManti-OTA começou a ser utilizado na diluição de 1/100 e passou para 1/5.000, um rendimento de 50 vezes a mais de reagente, diminuindo o custo e aumentando o número de análises possíveis.

No decorrer do experimento, problemas foram detectados e resolvidos em nosso laboratório como a presença de solventes voláteis em geladeira e problemas na lavadora de microplaca.

Sugere-se continuidade na pesquisa para melhorar o tempo de vida útil de OTA-BSA com testes comparativos de diferentes tampões, como o PBS vs. tampão carbonato-bicarbonato e outros tampões em bibliografia a ser consultada.

**EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DEOCRATOXINA A (OTA) EM PARÂMETRO
HEMATOLÓGICOS DE PINTAINHOS: INGESTÃO DE RAÇÃO *VERSUS*
INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA**

11.1 RESUMO

A contaminação de cereais e produtos relacionados à alimentação de animais de criação por micotoxinas, como OTA, representa um grande problema para saúde e economia no mundo. A exposição animal a OTA ocorre principalmente por ingestão, mas também pode ocorrer pelas vias dérmicas e por inalação. O presente trabalho comparou efeito de alterações hematológicas causadas por exposição de ocratoxina A (OTA), por via oral e por via subcutânea em frangos. Os parâmetros hematológicos foram comparados com os dados obtidos por exposição de 42 aves, de 01 dia de idade, com ração contaminada com OTA nas doses de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 e 1,1 mg de OTA/kg de ração, respectivamente e, de 36 aves, de 05 dias de idade expostos por inoculação subcutânea de OTA nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,5; 0,9; 1,3 e 1,7 mg de OTA/kg de peso corporal, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram níveis de hemoglobina, hematócrito, números de eritrócitos, leucócitos circulantes alteradas com menor nível de exposição de OTA por via subcutânea em pintainhos (Cobb) que por via oral, exceto número de heterófilos circulantes onde a alteração foi mais evidente com a exposição por via oral. Os números de linfócitos circulantes foram alterados a partir da mesma dose de exposição. Pode se concluir que a alteração hematológica ocorre com a exposição de OTA por via subcutânea em baixa dose, portanto mais evidente que a exposição por via oral em pintainhos. Um estudo das causas dos motivos pelos efeitos metabólicos e cinéticos foram apresentados e sugerem-se novas pesquisas para dar mais clareza ao que ocorre com a OTA no organismo de aves.

11.2 INTRODUÇÃO

Ocratoxina A é uma micotoxina de ocorrência comum em regiões de clima temperado. Pode ocorrer em milho, matéria-prima essencial de ração para animais de produção. Em organismos animais, a ocratoxina A (OTA) causa uma patologia chamada de ocratoxicose que causa redução do consumo de ração, perda de peso, apatia, penas arrepiadas, aumento da ingestão de água, diarreia e atinge principalmente os rins e fígado, entre outras alterações, em animais contaminados por essa micotoxina.

Para o Brasil é de grande importância aumentar a compreensão sobre os efeitos de OTA em frango por se tratar de um dos grandes produtores de carne de frango no mundo.

Este trabalho avaliou as diferenças de efeito de OTA em parâmetros hematológicos de frango de linhagem Cobb, evidenciando as diferenças de alterações de inoculação de OTA pela via oral e pela via subcutânea.

11.3Material

11.3.1 Aves

Dois grupos de aves receberam tratamentos diferentes. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UEL (anexo 1), como descrito a seguir.

11.3.1.1 Grupo 01 – Inoculação oral de OTA

O experimento foi realizado com 42 pintainhos de linhagem Cobb de 01 dia de idade, não sexados, livres de patógenos específicos de um incubatório local em Londrina, Paraná, Brasil, por um período de 21 dias. Antes de liberá-los na granja do experimento, o local foi cuidadosamente limpo e foram posteriormente fumigado KMnO₄ e formalina (1:2). As aves foram mantidas sob condições de higiene estritas e foram mantidas com ração de frango do primeiro ao último dia do experimento. Alimentação e água foram fornecidas *ad libitum* sem probióticos, antibióticos, promotores de crescimento ou drogas terapêuticas.

11.3.1.2 Preparo de ração contaminada com OTA

OTA foi adquirida da empresa Sigma (EUA, CYAM-11439-10Mg) ressuspensa em etanol (1mg de OTA para 10 ml) para dissolver a micotoxina completamente. Esta suspensão foi então misturada uniformemente na quantidade necessária de alimento basal para preparar a mistura experimental contendo cada concentração desejada de OTA, 3 dias antes do início do experimento, a fim de uniformizar a distribuição.

11.3.1.3 Delineamento experimental

Pintainhos de linhagem Cobb de um dia foram divididos em 7 grupos (A a G), tendo 6 aves cada grupo. Um grupo recebeu apenas ração (grupo A) para servir de controle, enquanto os grupos B, C, D, E, F e G, receberam ração contaminada com OTA a 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 e 1,1 mg OTA/kg na ração, respectivamente, por um período de 21 dias. Todo o experimento foi conduzido de acordo com as regras e regulamentações do Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA No. 18419.2013.89) (anexo), Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Londrina. As baias foram mantidas à aproximadamente

33°C na primeira semana, à aproximadamente 32°C na segunda semana e à aproximadamente 24° pelo restante do experimento, com 60% umidade relativa, e com ciclo de claridade de 12h; todos os animais tiveram acesso à água fresca e ração contaminada com OTA, exceto o grupo controle, *ad libitum* durante 21 dias.

Após o abate das aves, amostras do fígado e peito foram colhidas, identificadas e mantidas a -80°C.

11.3.2 Grupo 02 – Inoculação de OTA pela via subcutânea

O experimento foi realizado com 36 pintainhos de linhagem Cobb de 05 dia de idade, não sexados, livres de patógenos específicos (Cobb) de um incubatório local em Londrina, Paraná, Brasil, por um período de 21 dias. Antes de liberá-los na granja do experimento, o local foi cuidadosamente limpo e foram posteriormente fumigado KMnO₄ e formalina (1:2). As aves foram mantidas sob condições de higiene estritas e foram mantidas com ração de frango do primeiro ao último dia do experimento. Alimentação e água foram fornecidas *ad libitum* sem probióticos, antibióticos, promotores de crescimento ou drogas terapêuticas.

11.3.2.1 Preparação de OTA

OTA foi adquirida da empresa Sigma (EUA, CYAM-11439-10Mg) ressuspensa em etanol (1mg de OTA para 10 ml) para dissolver a micotoxina completamente. Esta suspensão foi então misturada uniformemente e ajustada nas doses predeterminadas para injeção nas aves.

11.3.2.2 Delineamento experimental

Pintainhos de linhagem Cobb de um dia foram divididos em 6 grupos (A ao F), tendo 6 aves cada grupo. Um grupo recebeu apenas ração (grupo A) para servir de controle, enquanto os outros grupos receberam OTA subcutaneamente com 5 dias de idade nas doses de 0,1; 0,5; 0,9; 1,3; e 1,7 mg OTA/kg de peso corporal respectivamente. Todo o experimento foi conduzido de acordo com as regras e regulamentações do Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA No. 18419.2013.89) (anexo), Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Londrina. As baias foram mantidas à ~33°C na primeira semana, à ~32°C na segunda semana e à ~24° pelo restante do experimento, com 60%

humidade relativa, e com ciclo de claridade de 12h; todos os animais tiveram acesso à água fresca e ração *ad libitum* durante 21 dias.

Os animais foram abatidos no vigésimo primeiro dia.

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

13. Grupo 01 (inoculação oral) x Grupo 02 (inoculação via sub-cutânea)

Grupo 01 – Contaminação via oral por ração contaminada.

No grupo que recebeu OTA pela ração contaminada, observou-se o que pode-se chamar de ocratoxicose clássica, com lesão acentuada em rins e fígado, sinais clínicos como penas arrepiadas, apatia e diarreia acentuadas.

Grupo 02 – Contaminação via subcutânea

No grupo que recebeu OTA pela via subcutânea, sinais clínicos e lesões em órgãos foram mais brandos, exceto nos grupos E e F que receberam quantidade maior de OTA, apresentando também ocratoxicose clássica.

A tabela abaixo compara os resultados obtidos nos dois tratamentos (inoculação com OTA por ração contaminada Grupo 01 x inoculação pela via subcutânea Grupo 02) para melhor comparação.

Tabela 13. Comparação de resultados obtidos na inoculação oral e subcutânea.

| Grupo | 01 Ingestão de ração contaminada | 02 Administração via subcutânea |
|---------------------------|---|--|
| Delineamento experimental | 42 pintainhos (Cobb) de 01 | 36 pintainhos (Cobb) de 05 |

| | | |
|---------------------------------|---|---|
| | dia de vida 7 grupos com 6 animais cada Ração contaminada com OTA (mg/kg), <i>ad libitum</i> , 21 dias | dias de vida 6 grupos com 6 animais cada OTA diluída (1mg de OTA em 10 ml de etanol) por injeção subcutânea em mg de OTA/peso corporal |
| OTA | Ração contaminada mg OTA/kg, ração Grupo A – 0,0 mg de OTA Grupo B – 0,1 mg de OTA Grupo C – 0,3 mg de OTA Grupo D – 0,5 mg de OTA Grupo E – 0,7 mg de OTA Grupo F – 0,9 mg de OTA Grupo G – 1,1 mg de OTA | Dose única no 5° dia Grupo A – 0,0 mg de OTA Grupo B – 0,1 mg de OTA Grupo C – 0,5 mg de OTA Grupo D – 0,9 mg de OTA Grupo E – 1,3 mg de OTA Grupo F – 1,7 mg de OTA |
| Parâmetros hematológicos | | |
| Hematócrito | Foi reduzido nos grupos E, F e G quando comparados ao grupo A, enquanto não houve diferença observada nos hematócritos dos grupos B, C e D. | Foi reduzido nos grupos B, C, D, E e F quando comparados o grupo controle. |
| Eritrócitos | Foram reduzidos nos grupos D, E, F e G. | Foram reduzido nos grupos B, C, D, E e F. |
| Leucócitos | Foram reduzidos nos grupos C, D, E, F e G. | Foram reduzidos nos grupos B, C, D, E e F. |
| Hemoglobina | Foi reduzida nos grupos C, D, E, F e G. | Foi reduzida nos grupos B, C, D, E e F. |
| Heterófilos | Nos grupos C, D, E, F, e G aumentaram em relação ao grupo A. | Nos grupos E e F foram reduzidos quando comparados ao grupo A. |
| Monócitos | Aumentaram no grupo G e não houve diferença significativa nos grupos B, C, D, E e F. | Foi aumentado no grupo F. |
| Eosinófilos | Foram encontrados nos grupos F e G e não foi importante quando comparados ao grupo A. | Foram encontrados nos grupos D, E e F, mas não teve significância quando comparado ao grupo A. |
| Linfócitos | Foram reduzidos nos grupos D, E, F e G. | Foram reduzidos nos grupos D, E e F. |

Os dois grupos apresentaram alterações compatíveis com a ocratoxicose descritos na literatura, independente da via de contaminação.

Não obstante, salienta-se a diferença na intensidade de efeito provavelmente resultante da via de administração, principalmente perante parâmetros hematológicos e leucocitários.

Assim, o Grupo 02 (OTA administrado via subcutânea) apresentou alterações

hematológicos e leucocitários mais expressivos, ocorrendo alteração a partir da menor dose (0,1 mg de OTA), o que não ocorreu no grupo 01 (ingestão de OTA pela ração).

Os trabalhos sobre exposição de OTA tem consistentemente revelado que maior concentração de OTA ocorre em rim, seguido de fígado ou músculo e depois a gordura; todavia, outros tecidos incluem medula e córtex adrenal, pele, miocárdio, mucosa gástrica e medula óssea (HOPE&HOPE, 2012).

Outrossim, a maioria de informação sobre a cinética de OTA, independente de contaminação via oral ou intravenosa, sugere um *modelo aberto de dois compartimentos* (DIETRICH, HEUSSNER,& O'BRIEN, 2006). Neste modelo, o sangue representaria o compartimento central, enquanto todos os outros órgãos (independente de perfusão sanguínea), o compartimento periférico. Assim, presença de transportadores ativos de OTA em respectivos órgãos (compartimento periférico) determinaria a diferença de distribuição e cinética de eliminação entre diferentes espécies e sexos. O compartimento periférico, por sua vez, teria subdivisão, sendo capacidade de transporte ativo de OTA, em adição a difusão passiva. Estes fatores poderiam contribuir com maior permanência de OTA no plasma (DIETRICH, HEUSSNER,& O'BRIEN, 2006) e, causado alterações hematológicos e leucocitários mais expressivos em contaminação via sub-cutânea, obtido neste trabalho (Tabela 11).

Geralmente, o tempo de meia vida de eliminação de OTA é maior em sangue do que em tecidos, o que deve ser relacionado, em parte, a maior afinidade de ligação da toxina às proteínas do sangue (TAO, et al., 2018)

Após uma única dose oral de OTA, o nível máximo sérico foi detectado dentro de 10 a 48 horas em suíno e rato, de 2 a 4 horas em bezerro e em aproximadamente 25 minutos em coelho e frango respectivamente (FUCHS & HULT, 1992).

AL-ANATI& PETZINGER(2006), sugerem os efeitos de OTA na medula óssea e sistema imune. De modo sumário na Figura 13 esquematiza esses efeitos, que incluem redução de órgãos imunes vitais como (A) baço e (B) timo também causando prejuízo em anticorpo, resposta de imunoglobulina e hipocelulariedade na (C) corrente sanguínea, (D) medula óssea e (D) órgãos linfóides, como placa de Peyer. Efeitos imunotóxicos resultantes de morte celular ocorrida por (I) necrose como redução de tamanho de baço devido à mudança necróticas em centro germinativo do órgão e a (II) apoptose, por exemplo (2) redução de tamanho em timo devido mudanças por apoptose em córtex. (III) migração forçada de células de sistema imune para órgãos-alvo de OTA como rim e fígado, (IV)

inibição de síntese de proteína em tecidos regenerativos e (V) redução de imunoglobulinas e órgãos linfóides como placas de Peyer ou bursa de Fabricius.

Figura 13 – Efeitos de OTA em medula óssea e órgãos de sistema imunológico.

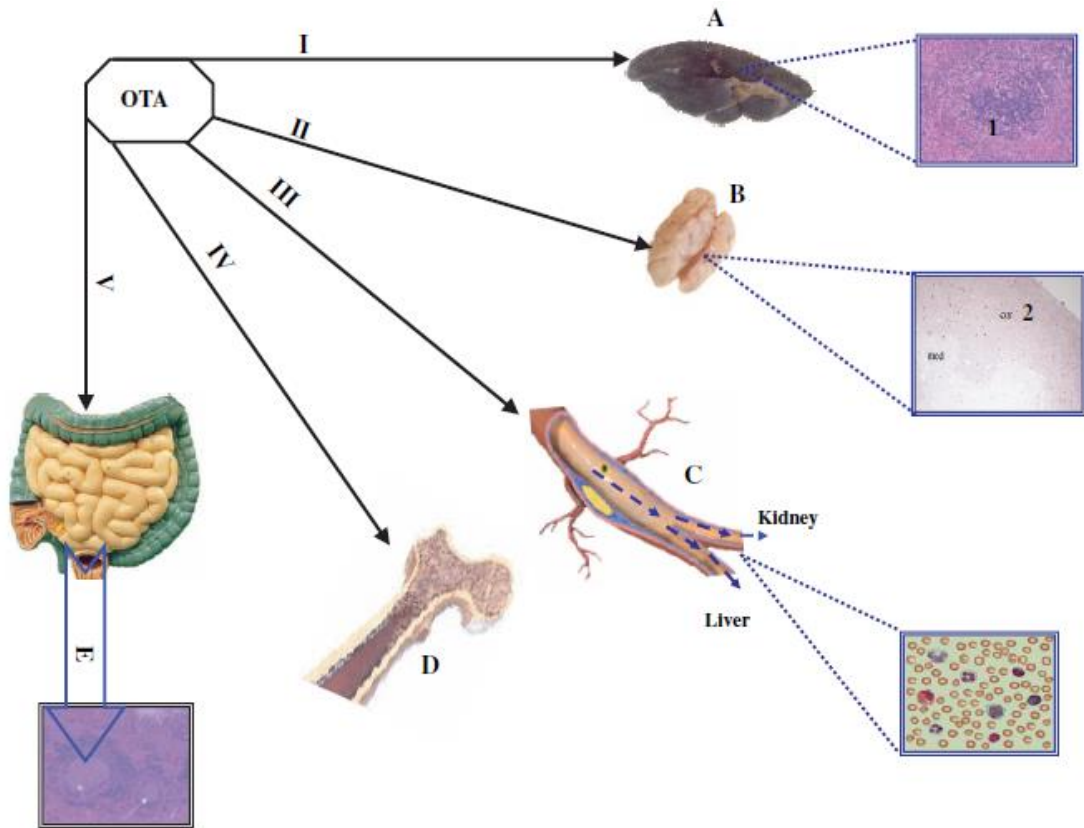
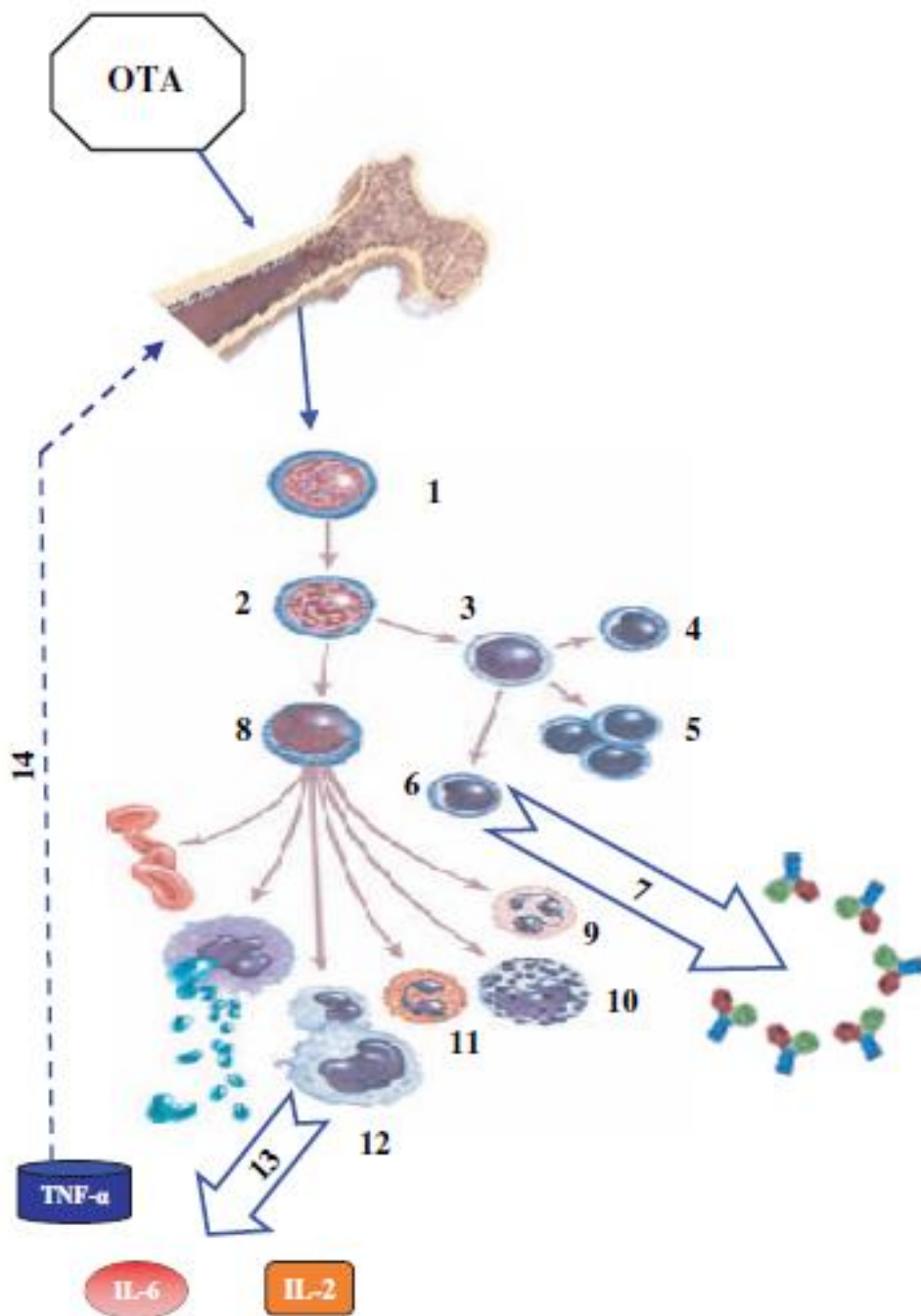


Figura 14 – Detalhamento de efeitos de OTA em medula óssea.



Os mesmos autores sugerem os efeitos hipotéticos de OTA em medula óssea (Figura 14). De modo resumido, os efeitos incluem depressão de medula óssea, subsequente alteração nas respostas imunes celular e humoral e hipocelulariedade na corrente sanguínea. Esses efeitos resultam de morte celular ocorrida pela necrose, apoptose e inibição de síntese proteica. Esses fatores somados causam redução (1) no número de células-tronco hematopoiéticas, (2) células-tronco multipotentes, (3) progenitores de linfócitos e (4) células natural killer, (5) linfócitos T e (6) linfócitos B. Isso leva a (7) redução de resposta de anticorpo e imunoglobulina. Redução em número de (8) células progenitoras de mielócito que leva a depressão em número e função de (9) neutrófilo, (10) basófilo, (11) eosinófilo e (12)

monócitos e macrófagos. Além disso, OTA causa (13) liberação de citocinas como IL-6, IL-2 e TNF- α que podem posteriormente ajudar no processo apoptótico induzido por OTA (AL-ANATI, L. & PETZINGER, E. 2006)

Em experimento *in vivo* em frango, os metabólitos detectados consistiram de 4(S)-OH-OTA, 4(R)-OH-OTA, 5'-OH-OTA, 7'-OH-OTA, 9'-OH-OTA, OTB, sendo os mesmos detectados também *in vitro* em microsossomo hepático de frango (YANG et al., 2015).

Os metabólitos derivados de OTA variam de espécie para espécie como mostra a Tabela 12.

Considerando que OTA ingerida (via ração) atravessa todo trato digestivo e sistema hepático de ave, sob diferentes processos metabólicos, em relação a administração direta pela via subcutânea, as interferências seriam (i) biodisponibilidade no organismo; (ii) tempo de eliminação do organismo; (iii) diferentes vias metabólicas; e (iv) produtos metabólicos variados. Estes fatores explicariam também as diferenças na resposta do organismo de ave, em particular parâmetros hematológicos e contagem de células sanguíneas nos diferentes tratamentos do experimento apresentado (Tabela 11).

Tabela 14.Metabólitos de OTA.

| Espécie | Método experimental | Material experimental | Metabólitos | Método de detecção |
|---------|---------------------|-----------------------|--|---|
| Frango | <i>In vitro</i> | Microsossomo hepático | 4(S)-OH-OTA 4(R)-OH-OTA 5'-OH-OTA 7'-OH-OTA 9'-OH-OTA OTB | UPLC-Q/TOF-MS |
| | <i>In vivo</i> | Fezes | 4(S)-OH-OTA 4(R)-OH-OTA 5'-OH-OTA 7'-OH-OTA 9'-OH-OTA OTB | UPLC-Q/TOF-MS |
| Suíno | <i>In vitro</i> | Microsossomo hepático | 4(S)-OH-OTA 4(R)-OH-OTA 5'-OH-OTA 7'-OH-OTA 9'-OH-OTA OTB | Espectrometria de ressonância magnética nuclear(NMR) UPLC-Q/TOF-MS |
| Rato | <i>In vitro</i> | Microsossomo hepático | 4(S)-OH-OTA 4(R)-OH-OTA 5'-OH-OTA 7'-OH-OTA 9'-OH-OTA OTB | UPLC-Q/TOF-MS |
| | | Hepatócito | 4-OH-OTA Pentose de OTA (hexose e pentose) (4R)-4-OH-OTA (4S)-4-OHOTA | Cromatografia de camada delgada |

| | | | |
|----------------|---------------|--|----------------------|
| <i>In vivo</i> | Urina | 4(S)-OH-OTA 4(R)-OH-OTA 5'-OH-OTA 7'-OH-OTA 9'-OH-OTA OTB 4(S)-OH-OTB 4(R)-OH-OTB OTHQ | UPLC-Q/TOF-MS |
| | Fígado e baço | Ochratoxin β (OT β) | LC-MS/MS e LC-TOF-MS |

Adaptação de TAO, et al., 2018.

Considerando que OTA sendo liberada no organismo de ave, pela ração contaminada e administrada diretamente pela via subcutânea, passou por diferentes vias processos metabólicos que podem interferir em (i) sua biodisponibilidade no organismo; (ii) tempo de eliminação do organismo; (iii) diferentes vias metabólicas; e (iv) produtos metabólicos variados, pode explicar as diferenças na resposta do organismo de ave, em particular parâmetros hematológicos e contagem de células sanguíneas nos diferentes tratamentos do experimento apresentado. É importante mencionar também que a maioria dos metabólitos de OTA são menos tóxicos que a própria OTA (TAO et al., 2018), isso pode explicar também que a OTA administrada pela via sub-cutânea, já que não passou pelos processos enzimáticos da digestão e do fígado, ficou em sua forma original e mais tóxica que seus metabólitos.

14. CONCLUSÃO

Os níveis de hemoglobina, hematócrito, números de eritrócitos, leucócitos circulantes são alteradas desde o menor nível de exposição de OTA por via subcutânea em pintainhos (linhagem Cobb) que por via oral, exceto número de heterófilos circulantes onde a alteração foi mais evidente com a exposição por via oral. Os números de linfócitos circulantes foram alterados a partir da mesma dose de exposição. Concluímos que as vias de exposição de ocratoxina A (oral *versus* subcutânea) influenciam nos parâmetros hematológicos de forma distinta em pintainhos e, as possíveis causas sejam devido efeitos metabólitos e cinéticos, o que sugere-se novas pesquisas para dar mais clareza ao que ocorre com a OTA no organismo de aves.

15. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Ocratoxina A é uma das mais importantes micotoxinas por ser encontrada em praticamente todo o mundo e ser uma das mais tóxicas. É fundamental para a ciência, compreender cada vez mais sobre suas propriedades e efeitos em organismos biológicos.

Com uma pesquisa simples e eficaz, este trabalho obteve sucesso na otimização de imunoensaio empregando a técnica do i-ELISA (ELISA indireto). Foram avaliados e resolvidos problemas na lavadora de microplaca, otimização de diluição de anticorpo primário anti-OTA, utilizando a OTA como analito, conjugada com BSA (sigla em inglês de albumina de soro bovino).

Também foram avaliadas as diferenças em parâmetro hematológico de efeitos da OTA em pintainhos (linhagem Cobb) com uma pesquisa bibliográfica para explicar os possíveis motivos das diferenças de efeitos da micotoxina em inoculação oral comparada à inoculação subcutânea.

16. BIBLIOGRAFIA

ABRUNHOSA, L.; VE ÂNCIO, A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnol Lett**, 29, p. 1909 – 1914, 2007.

AL-ANATI , L. & PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **J. vet. Pharmacol. Therap**, vol. 29, p. 79–90, 2006.

AQEEL, Z., BLOOD, N., TURNER, J. Investigation of Methanol Loss from Solvent Reservoirs and Its Potential Mitigation by the Use of SecurityCAP™, InformativoPhenomenex , p. 1 – 4, 2018.

AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; LINDBLADE, K.; GIESEKER, K.; ROGERS H. S.; KIESZAK, S. NJAPAU, H.; SCHLEICHER, R.; MCCOY, L. F.; MISORE, A.; DECOCK, K.; RUBIN, C.; SLUTSKER. L. & *Aflatoxin Investigative Group*. *Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004*. **Environ Health Perspect**. vol.113, p. 1779 – 1783, 2005.

BOGS, C., BATTILANI, P., GEISEN, R. Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* cured meats. **International Journal of Food Microbiology**, ed. 107, p. 39-47, 2006.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plants, animal and human systems. **Task force report**. Report n. 139. Ames: Iowa; 2003.

CHEN, S. Y.; CHEN, C. J.; TSAI, W. Y.; AHSAN, H.; LIU, T. Y.; LIN, J. T.; SANTELLA, R. M. *Associations of plasma aflatoxin B1-Albumin adduct level with plasma selenium level and genetic polymorphisms of Glutathione S-Transferase M1 and T1*. **Nutr Cancer**. v. 38, p. 179 – 185, 2000.

CHOUDHARY, A. K., & KUMARI, P. Management of mycotoxin contamination in preharvest and post harvest crops: present status and future prospects. **Journal of Phytology**, v. 2 (7), p. 37-52, 2010.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins, In: Sharma, P. P. & Salunkhe, D. K. Eds Mycotoxins and phytoalexins. Boca Raton, **CRC Press**, p. 103 – 143, 1991.

DIETRICH, D. R., HEUSSNER, A. H., & O'BRIEN, E. Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 45-52, 2006.

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

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M.; A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 187-198, 2010.

EGMOND, V. H. P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard method of sampling and analysis. **Food Addit Contam.**, p. 139 – 188, 1989.

ELAROSSI, M. A., MOHAMED, F. R., EL BARKOUKY, E. M., ATTA, A. M., ABDOU, A. M., HATAB, M. H., Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. **Avian Pathol**, v. 35, p. 236-269, 2006.

F.I.B., As micotoxinas, **Food Ingredients Brasil**, n. 7, p. 32 – 40, 2009.

FINK-GREMMELS, J.; JAHN, A.; BLOM, M. J. Toxicity and Metabolism of Ochratoxin A. **Natural Toxins**, New York, n.3, p. 214-220, 1995

FUCHS, R. & HULT, K. Ochratoxina in blood and its Pharmacokinetic properties. **Fd Chem. Toxic.** vol. 30, n. 3, p. 201-204, 1992.

FUJII, S.; ONO, E. Y. S.; RIBEIRO, R. M. R.; ASSUNÇÃO, F. G. A.; TAKABAYASHI, C. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ITANO, E. N.; UENO, Y.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. A Comparison between Enzyme Immunoassay and HPLC for Ochratoxin A Detection in

Green, **Roasted and Instant Coffee. Brazilian archives a biology and technology**, vol. 50, n. 2, p. 349 – 359, 2007.

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.

GIANCARLO, B.; ELISABETTA, B.; EDMONDO, C.; VALERIANA, C.; GIUSEPPINA, T.; Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC–FLD. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1278-1282, 2011.

HANIF, N. Q.; MUHAMMAD, G.; SIDDIQUE, M.; KHANUM, A.; AHMED, T.; GADAHAI, J. A.; KAULAB, G.; Clinico-pathomorphological, serum biochemical and histological studies in broilers fed ochratoxin A and a toxin deactivator (Mycofix Plus). **Br PoultSci**, v. 49, p. 632-642, 2008.

HEFLE, S. L. Immunoassay fundamentals. **Food Technol.** 49, p. 102 – 107, 1995.

HOPE, J. H. & HOPE, B. E. A Review of the Diagnosis and Treatment of Ochratoxin A Inhalational Exposure Associated with Human Illness and Kidney Disease including Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Journal of Environmental and Public Health**, 2012.

HIPÓLITO, A. S. M., Dissertação de Mestrado Deteção e quantificação de leite pelo método ELISA no Laboratório SGS. Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa, 2017.

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.

IARC (*International Agency For Research On Cancer*) vol. 56, p. 489, 1993.

ISHIKAWA, A. T. HIBRIDOMA OTA.1: ANTICORPO ANTI-OTA NO DESENVOLVIMENTO DA COLUNA DE IMUNOAFINIDADE E APLICAÇÃO

ASSOCIADA À QUALIDADE E SEGURANÇA DE VINHO. Dissertação de Mestrado – DCTA/UDEL, 2012.

JOO, Y. D., KANG, C. W., AN, B. K., AHN, J. S., BORUTOVA, R. Effects of ochratoxin A and preventive action of a mycotoxin-deactivation product in broiler chickens. **Vet Med Zoo**, T. 61 (83), 2013.

KADIR, M. K. A.; TOTHIL, I. E. Optimization of indirect immunoassay for aflatoxin B1 detection. **J. Trop. Agric. and Fd. Sc.** 41(1), p. 81 – 93, 2013.

KAWAMURA, O.; SATO, S.; KAJII, H.; NAGAYAMA, S.; OHTANI, K.; CHIBA, J.; UENO, Y. A sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent assay of Ochratoxin A based on Monoclonal Antibodies. **Toxicon**, v. 27, n. 8, p. 887-897, 1989.

KOLOSOVA, A. Y., SHIM, W., Yang, Z., EREMIN, S.A., CHUNG, D. Direct competitive ELISA based on monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1 – stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Anal Bioanal Chem.* 384, p. 286-294, 2006.

KRSKA, R., MOLINELLI, A. Mycotoxin analysis: State of the art and future trends. **Anal Bioanal Chem.** 387 p. 145-148, 2007.

LIM, P. W. Development Of An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) For The Detection Of Pistachio Residues In Processed Foods. University of Nebraska, 2010.

LÚCIO, C. H., PINTO, N. F. J., MARRIEL, I. E. Otimização do método de Elisa indireto não-competitivo para detecção e quantificação de aflatoxina B1 em cereais. Comunicado Técnico 152. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ISSN 1679-0162, Sete Lagoas, MG Dezembro, 2007.

JØRGENSEN, K. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food – A review of EU occurrence data. **Food Additives and Contaminants, Supplement 1**, p. 26-30, 2005.

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.

MONACI, L., TREGOAT, V., VAN HENGEL, A. J., & ANKLAM, E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, 223(2), p. 149–179, 2006.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxin. **J. Applied Microbil.** Symposium . v. 4. p. 62 – 76, 1998.

NEMZEK, J.A.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D. G. Development and optimization of cytokine ELIS using commercial antibody pairs. **Journal of Immunological Methods**, 255, p. 149 – 157, 2001.

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.

ONO, E. Y. S.; BORDINI, J. G.; OMORI, A. M.; HIROZAWA, M. T.; ONO, M. A. Métodos imunológicos para a detecção de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos, alimentos e rações. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**—vol. 4, p. 895 – 935, 2016.

OSTRY, V.; MALIR, F.; TOMAN, J.; GROSSE, Y. Mycotoxins as human carcinogens – The IARC Monographs classification. **Mycotoxins Res.** Verlag Berlin Heidelberg, 2016.

PITT, J., HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. New York City: Springer, 2009.

PFOHL-LESZKOWICZ, A, PETKOVA-BOCHAROVA, T., CHERNOZEMSKY, I. N. & CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, London, v.19, n.3, p.282-302, 2002.

PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, 13, p. 49-50, 1996.

POHLAND, AE.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L.; *Ochratoxin A, a review*. **Pure, Appl. Chem.**, v. 64, p. 1029-1046, 1992.

RC (2006/576/CE) - RECOMENDAÇÃO DA COMISSÃO de 17 de Agosto de 2006 sobre a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal (2006/576/CE).

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.

Recomendação da Comissão de 17 de Agosto de 2006 sobre a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal. *Jornal Oficial da Comissão Europeia*, L 229/7, 2006.

Regulamento (CE) N.1881/2006 Da Comissão de 19 de Dezembro de 2006. *Jornal Oficial da União Europeia*, L. 364.5, 2006.

Regulamento (CE) N.401/2006 DA COMISSÃO de 23 de Fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 70/12, 2006

RONCADA, P., MALAGUTTI, L., CARTA, F., GREPPL, G. F. Swine ochratoxicosis: proteomic investigation of hepatic bioindicators. **Veterinary Research Communications**, v. 28, p. 371–375, 2004.

SCHWARTZ, G. G. Hypothesis: does ochratoxin A cause testicular cancer? **Cancer Causes & Control**, Frankfurt, v.13, n.1, p.91-100, 2002.

SCHUBERT-ULLRICH, P., RUDOLF, J., ANSARI, P., GALLER, B., FÜHRER, M., MOLINELLI, A., & BAUMGARTNER, S. Commercialized rapid immunoanalytical tests for

determination of allergenic food proteins: An overview. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 395(1), p. 69 – 81, 2009.

SILVA, D. L. D. Anticorpo monoclonal de altaeficiência no desenvolvimento de imunoquímicaaplicada- análise de ocratoxina emvinho. Tese (DoutoradoemCiência de Alimentos) - UniversidadeEstadual de Londrina, Londrina-PR, 2010.

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, p. 508 – 535, 1992.

SMITH, E. E., KUBENA, L. F., BRAITHWAITE, C. E., HARVEY, R. B., PHILLIPS, T. D.& REINE, A. H. *Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens*. **Poult Sci**. vol. 71, p. 1136 – 1144, 1992

SOUZA, M.L.M.; SULYOK, M.; SILVA, O.F.; COSTA, S.S.; BRABET, C.; JUNIOR, M.M.; SEKIYAMA, B.L.; VARGAS, E.A.; KRSKA, 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.

STOEV, S. D. The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluation. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhatan, v.40, n.6, p.352-360, 1998.

STOEV, S. D., ANGUELO, G.,IVANOV, I., & PAVLOV, D. Influence of ochratoxin A and an extract of artichoke on the vaccinalimmunity and health in broiler chicks. **Exp Toxic Pathol**,v. 52, p. 43-55, 2000.

STOEV, S. D., PASKALEV, M., MACDONALD, S.& MANTLE, P. G. Experimental one year ochratoxinAtoxicosis in pigs.**Exp Toxic Pathol**, vol. 53, p. 481-487, 2002.

TAO, Y., XIE, S., XU, F., LIU, A., WANG, Y., CHEN, D., PAN, Y., HUANG, L., PENG, D., WANG, X. & YUAN, Z. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 112, p. 320–331, 2018.

TASK 3.2.7 "Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A By The Population of EU Member States", Directorate-General Health and Consumer Protection, Istituto Superiore di Sanità – Rome – Italy, Jan/2002.

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.

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

XIAO H., MARQUARDT R.R., FROHLICH A.A., LING Y.Z. Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 524-530, 1995.

XIAO H., MADHYASTHA S., MARQUARDT R.R., LI S., VODELA J.K., FROHLICH A.A., KEMPPAINEN B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 137, n. 2, p. 182-192, 1996.

YANG, S., ZHANG, H., DE SAEGER, S., DE BOEVRE, M., SUN, F., ZHANG, S., CAO, X., WANG, Z. In vitro and in vivo metabolism of ochratoxin A: a comparative study using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** vol. 407, p. 3579–3589, 2015.

ZHANG, A.; MA, Y.; FENG, L.; WANG, Y. F.; HE, C.; WANG, X.; ZHANG, H. Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food control*, n. 22, p. 1723 – 1728, 2011.

ZÖLLNER, P.&, MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1136, p. 123-139, 2006.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 189/2013

Londrina, 29 de Novembro de 2013.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 30 de Julho de 2013 avaliou o protocolo intitulado "Efeito da fumonisina B₁ (FB₁) e ocratoxina-A (OTA) no sistema imune/resposta imune e níveis séricos de FB₁ e OTA em frangos" processo CEUA nº18419.2013.89, do Centro de Ciências Biológicas desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto de pesquisa foi aprovado para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizado 294 pintainhos machos *Gallus gallus* com o peso de 50g e idade de 1 dia e 500 frangos *Gallus gallus* machos com peso de 2kg e idade aproximada de 40 dias. O objetivo do projeto é analisar os efeitos de micotoxinas no sistema imunológico, bem como investigar possível efeito negativo das micotoxinas em vacinação e analisar micotoxinas em soros de frangos do Paraná. Para isto os animais serão alojados em condições ideais, sendo que no primeiro experimento a ração poderá conter micotoxinas OTA. No segundo a ração poderá conter concentrações distintas de micotoxina FB₁. No terceiro os animais serão tratados com alimentos contendo ambas micotoxinas. No quarto e quinto experimento as micotoxinas serão administradas por via subcutânea. No sexto e sétimo experimento, será avaliada a influência das micotoxinas quanto à imunização e a vacinação contra *Salmonella enteritidis* em frangos. No último experimento, amostras de sangue serão coletadas das aves de aviários diversos do Paraná para análise de contaminação com micotoxina nestes animais. Os procedimentos experimentais foram aprovados para execução em 36 meses após esta data.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de aula prática aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

Waldiceu Ap. Verrri Junior

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

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Dra. Égle Maria de Souza (Chefe de DCA/PROPPG) e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.