



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

CÁSSIA REIKA TAKABAYASHI YAMASHITA

**GERAÇÃO DE HIBRIDOMA E IMUNOENSAIO  
EMPREGANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA  
DETECÇÃO DE TOXINAS NATURAIS**

---

Londrina  
2013

CÁSSIA REIKA TAKABAYASHI YAMASHITA

**GERAÇÃO DE HIBRIDOMA E IMUNOENSAIO  
EMPREGANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA  
DETECÇÃO DE TOXINAS NATURAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de  
Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka.

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

T136g Takabayashi Yamashita, Cássia Reika.

Geração de hibridoma e imunoenensaio empregando anticorpos monoclonais para detecção de toxinas naturais / Cássia Reika Takabayashi Yamashita. – Londrina, 2013.

138 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Microbiologia – Teses. 2. Anticorpos monoclonais – Teses. 3. Toxinas – Teses. 4. Hibridomas – Teses. 5. Técnicas imunológicas – Teses. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

CÁSSIA REIKA TAKABAYASHI YAMASHITA

**GERAÇÃO DE HIBRIDOMA E IMUNOENSAIO  
EMPREGANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA  
DETECÇÃO DE TOXINAS NATURAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de  
Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Myrna Sabino  
Instituto Adolfo Lutz - IAL

---

Prof. Dr. Benedito Corrêa  
Universidade de São Paulo - USP

---

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

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

Londrina, 02 de setembro de 2013.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia – Micotoxinas e Ficotoxinas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Centro de Ciências Agrárias) sob orientação da Profa Dra Elisa Yoko Hirooka da Universidade Estadual de Londrina; Laboratório de Cromatografia da Bioquímica e Biotecnologia – CCE da Universidade Estadual de Londrina; Food Hygiene Laboratory, Faculty of Agriculture, Kagawa University.

O apoio contou com Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (concessora da bolsa doutorado); Coodenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (concessora da bolsa sanduíche doutorado); Projeto no.23 – Rede Nanobiotec-Brasil, CAPES; Projeto Edital CNPq / MAPA / SDA N° 064/2008 e PROPPG/UEL.

*Aos meus familiares, por sempre acreditar em mim e  
me incentivar, mesmo estando longe.*

*Ao Henrique, por todo amor e compreensão*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela orientação, paciência, incentivo e valiosos ensinamentos;

Ao Dr. Osamu Kawamura de Kagawa University, Japão, pela orientação e supervisão, especialmente durante a bolsa sanduíche; pelo fornecimento de híbridos produtores de anticorpos anti-micotoxinas; sem os quais este trabalho não seria possível;

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Depto. Ciência de Alimentos, pelos preciosos ensinamentos e colaboração durante o desenvolvimento do Mestrado e Doutorado;

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão das bolsas de doutorado e apoio financeiro;

À CAPES, CNPq e SETI-UFG-Fundo Paraná pelo apoio financeiro com os projetos;

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela valiosa orientação, auxílio no desenvolvimento técnico;

Ao Dr. Ken-Ichi Harada, Meijo University – JP e Dra Elisabete H. Hashimoto pela toxina MC-LR purificada e colaboração;

À Doutora Simone Fujii, pelos preciosos ensinamentos desde a época de estágio, apoio, colaboração, prontidão em esclarecer dúvidas;

Aos colegas Angélica Tieme Ishikawa, Thiago Montagner Souza, Wagner Ezequiel Risso, Tatiana A. Miguel, Joice Sifuentes dos Santos, Dani Luce Doro da Silva, Luciana P. Bernd, Tatiane Martins Oliveira e Daiane Dias pelo precioso apoio, colaboração, dicas, companheirismo e, sobretudo, amizade;

À Ana Lúcia de Souza Madureira Felício, Leonardo Fonseca Maciel e Felipe P. Fracalossi pelo apoio na extrações e análise das micotoxinas;

Às estagiárias Agata B. Rodrigues e Renata Y. Hamada pelo auxílio no desenvolvimento de imunoensaio anti-zearalenona;

Ao Dr. Douglas Fernandes Barbin pelo auxílio na escrita do trabalho em Inglês;

Aos estagiários Ligia M. Martins, Vitor Hugo P. Galerani, Pamela L. R. Chagas, Jaime T. Piza, Livia M. Medici, Alessandra M. Gasperini, Maria Thereza C. Fernandes, Catia L. Yokoyama, Artur K. Bagatin pelo apoio, colaboração e companheirismo;

Aos alunos Ryoya Aritomi, Taniguchi, Ho Huynh Tu Mi, Manita Soontornjanagit, Shiho Tanaka, Hiromi Tougaki, Megume Ishida, Asuka Iwata, Sakata, Wongworapat Kraisate, Fan

Jinping, Pham Phoung Ha pelo precioso apoio, colaboração, dicas, companheirismo e alegrias durante a permanência em Kagawa University;

Ao grupo de pesquisa, tanto da área de química, biotecnologia, imunologia como da engenharia sanitária;

A todos os funcionários e técnicos do Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Neusa Cassula, Sandra Rezende, Nelson, Rubens, Célia, Irene, Alessandra, Berenice, Elza Youssef, e D. Marília pela preciosa ajuda no laboratório, com reagentes, pedidos e favores;

Aos amigos e colegas, Cintia L. Handa, Juliano Zanela, Diogo G. Pedrollo, Karla B. Guergoletto, Gislaine Silveira, Marinês P. Corso, Tatiana Pimentel, Marsilvio L. Morais Filho, Gisele Nobre, Luciane Y. Yoshiara, Caroline M. Calliari, Michele Rosset, Fernando S. Lima, Thais Bau, Danielle C. B. Honorato pelo companheirismo, momentos de descontração e alegria, que suavizaram os dias árduos de trabalho;

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

“Por aqui, no entanto, não olhamos para trás por muito tempo. Nós seguimos em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos ... e a curiosidade nos conduzindo por novos caminhos.”

Walt Disney

TAKABAYASHI YAMASHITA, Cássia Reika. **Geração de hibridoma e imunoenensaio empregando anticorpos monoclonais para detecção de toxinas naturais**. 2013. 138 pág. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O contínuo monitoramento através de método rápido confiável de alta sensibilidade, especificidade, precisão e econômico, é o procedimento preventivo apropriado visando redução da exposição humana e animal a toxinas naturais, com ênfase a micotoxinas e cianotoxinas. Em consideração ao papel destaque da imunquímica como bioferramenta de escolha na detecção *in loco* de toxinas, o trabalho abrangeu inovação tecnológica desde desenvolvimento de hibridoma para produção de anticorpo monoclonal - AcM contra molécula não-imunogênica de baixa massa molecular, proliferação celular para produção de AcM, à padronização – otimização de imunoenensaio indireto competitivo ic-ELISA para o controle de qualidade na cadeia produtiva. O desenvolvimento de hibridoma foi conduzido com microscistina LR – MC-LR, cianotoxina de ocorrência potencial em água eutrofizada. A proliferação celular de hibridoma AF.2 e ZEN.2 foi conduzido *in vitro* (meio RPMI 1640 e *Hybridoma Serum Free Media* – H-SFM). O AcM produzido foi purificado e, após padronização metodológica, aplicado na análise de aflatoxina (AF) e zearalenona (ZEA) por ic-ELISA e CLAE; a otimização da análise de desoxinivalenol (DON) foi conduzida com AcM previamente produzido por DON.3. A fusão celular para desenvolver hibridoma secretor de AcM contra MC-L foi testada com conjugado MC-LR-KLH (128 dias, sete injeções) e, MC-LR-BSA (49 dias, 4 injeções, obtendo 9 clones) em camundongo BALB/c fêmea. Estes procedimentos não geraram híbridos produtores de AcM com alta afinidade a MC-LR, testado por ic-ELISA. Este ic-ELISA para seleção de clone foi estabelecido com: 1µg/mL de MC-LR-KLH; 0,1% de leite desnatado/PBS para bloqueio; AcM anti-MC-LR em PBST; anticorpo secundário em PBST (IgG anti-*mouse* conjugado com fosfatase, 1: 2000) e substrato *para*-nitro fenil fosfato - pNPP. Os híbridos AF.2 e ZEN.2 produziram AcM de alta especificidade, aliado a baixa reatividade cruzada contra micotoxinas (DON, OTA e ZEA ou AF). O produto de hibridoma AF.2, obtido em H-SFM, consistiu de AcM de alta pureza com teor proteico de 0,94 mg/mL, não ocorrendo o mesmo com hibridoma ZEN.2 em RPMI 1640 adicionado de 10 % de soro fetal (teor proteico de 2,06 mg/mL). O ic-ELISA visando aplicação no controle de qualidade foi desenvolvido com AcM produzido, sendo estabelecido para análise de AF total: 250 ng/mL de AFB<sub>1</sub>-BSA, 1:10<sup>4</sup> de AcM anti-AF (0,094 µg/mL), 1:2000 de IgG anti-*mouse* HPR e 0,1 % de BSA para bloqueio. A curva padrão (0 a 5 ng/mL de AFB<sub>1</sub>) apresentou coeficiente R<sup>2</sup> de 0,996 e correlação de Pearson de -0,93. A aplicabilidade de AcM para análise de AF, DON e ZEA em milho foi avaliado perante interferência de matriz e recuperação. A interferência de matriz na análise de AF permaneceu semelhante a partir de diluição 1:5 (p>0,05), obtendo-se limite de detecção (LD) de 2 e quantificação (LQ) de 4,6 µg/Kg, com recuperação média de 113, 106 e 104 % nas concentração de 10, 20 e 40 µg/Kg, respectivamente (coeficiente de variação – CV 6 a 20 %). Analisando AF em 75 amostras de milho por ic-ELISA e CLAE, oito apresentaram-se positiva por ambos os métodos (razão ELISA/CLAE, 0,8 a 1,2). Cinco amostras positivas por CLAE foram negativas por ic-ELISA, devido à diferença no LD e LQ. O parâmetro estabelecido para análise de DON por ic-ELISA em milho, trigo e derivado (biscoito) foi: 2 µg/mL de DON-HS-OVA; 1:2000 de AcM anti-DON (10,9 µg/mL). O AcM produzido por hibridoma DON.3 permitiu análise de biscoito sem requerer diluição da matriz (LD 159,3 e LQ 370 µg/Kg), i.e., sensibilidade superior ao obtido para análise de milho (diluição 1:5; LD 302,8; LQ 589,3 µg/Kg). A recuperação de DON em biscoito artificialmente contaminado (500, 1000 e 2000 µg/Kg) foi de 95 a 106 % (CV 3 a 8 %); em milho, a mesma foi de 95 a 106 % (CV 7 a 11 %). Analisando DON em 29 amostras de biscoito por ic-ELISA e CLAE, o coeficiente de correlação (r) foi 0,72 (razão ELISA/CLAE, 0,4 a 15,8). Procedendo mesma análise em milho (75), cinco amostras apresentaram positivas por ambas as técnicas, embora 49 amostras foram quantificadas por CLAE (LQ de 30,4

$\mu\text{g/Kg}$ ) e 6 por ic-ELISA (LQ de 589,3  $\mu\text{g/Kg}$ ). Os parâmetros estabelecidos para análise de ZEA por ic-ELISA foram: 2,5  $\mu\text{g/mL}$  ZEA-OVA e 1:200 de AcM anti-ZEA (10,3  $\mu\text{g/mL}$ ). A interferência de matriz na análise de ZEA em milho (LD 51,7 e LQ 93,2  $\mu\text{g/Kg}$ ) e biscoito (LD 9,7 e LQ 23,7  $\mu\text{g/Kg}$ ) foi semelhante a partir da diluição 1:5 ( $p > 0,05$ ), enquanto que o trigo requereu diluição a 1:10 (LD 33,5 e LQ 87  $\mu\text{g/Kg}$ ). A recuperação média em milho artificialmente contaminado variou de 98 a 108 % (CV 3 a 9 %); 97 a 112 % em trigo (CV 2 a 8 %), e em biscoito 96 a 102 % (CV 4 a 7 %). A análise de ZEA em milho (36 amostras) por ic-ELISA e CLAE apresentou  $r = 0,77$ . Considerando o limite máximo de 400  $\mu\text{g/Kg}$  para ZEA pela legislação brasileira, 16 amostras de milho apresentaram nível superior determinado por ambas as técnicas, embora duas apresentassem valores distintos (509,3 vs 218,8  $\mu\text{g/Kg}$  e 388,6 vs 430,3  $\mu\text{g/Kg}$ , sendo ic-ELISA vs CLAE). Analisando ZEA em trigo (125) por ic-ELISA e CLAE, cinco apresentaram-se positivas, em relação a 74 amostras negativas. Analisando ZEA em biscoito, 9 amostras apresentaram-se positivas por ic-ELISA (31,3 a 95  $\mu\text{g/Kg}$ ), comparada a 21 positivas por CLAE (0,9 a 92,2  $\mu\text{g/Kg}$ ). O ic-ELISA desenvolvido com AcM produzido no Laboratório (hibridoma AF.2, ZEN.2 e DON.3) demonstraram estabilidade das microplacas sensibilizadas por pelo menos duas semanas a 10 °C, ratificando a aplicação na triagem rápida de micotoxinas na cadeia produtiva de alimentos.

**Palavras-chave:** Hibridoma, anticorpo monoclonal, imunensaio, micotoxinas, microcistina

TAKABAYASHI YAMASHITA, Cássia Reika. **Hybridoma generation and immunoassay employing monoclonal antibodies for natural toxins detection.** 2013. 138 p. Thesis (Doctorate's Degree in Food Science) – Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, Londrina, 2013.

### ABSTRACT

The continuous monitoring through rapid, reliable, high sensitivity, specificity, precision, robustness and economic method is the appropriate preventive procedure aimed at reducing human and animal exposure to natural toxins, with emphasis on cyanotoxins and mycotoxins. Considering the prominent role of immunochemistry as chosen biotool for in situ detection of toxins, this work covered technological innovation since the development of hybridoma producer of monoclonal antibody - mAb against non-immunogenic molecule of low molecular mass, cell proliferation for mAb production, standardization – optimization of indirect competitive immunoassay - ic-ELISA for quality control in the production chain. The development of hybridoma was conducted using microcystin LR - MC-LR, cyanotoxin of potential occurrence in eutrophic water, due to great advances in the Brazilian agricultural production. The AF.2 and ZEN.2 hybridoma cell proliferation was conducted in vitro (RPMI 1640 and Hybridoma Serum Free Media - H-SFM). The mAb was produced and purified, and applied in analysis of aflatoxin (AF) and zearalenone (ZEA) by ic-ELISA and HPLC after standardization of method. Optimization of deoxynivalenol (DON) analysis was conducted with mAb previously produced by DON.3 stored at -20 ° C. The cell fusion carried out for developing hybridoma secreting MAb against MC-LR was tested in conjunction with MC-LR-KLH (128 days, seven injections), and MC-LR-BSA (49 days, 4 injection, getting 9 clones) in mouse BALB/c female. These procedures did not generate hybrids producing mAb with high affinity to MC-LR, tested by ic-ELISA. The i-ELISA for clone selection was established as: 1µg/mL MC-LR-KLH, 0.1% skimmed milk / PBS for blocking; mAb anti-MC-LR in PBST; second antibody in PBST (IgG anti-mouse conjugated with phosphatase, 1:2000) and substrate *para*-nitrophenyl phosphate-PNPP. The AF.2 and ZEN.2 hybrids produced high specificity MABs coupled with low cross-reactivity against other group of mycotoxins. The product of AF.2 hybridoma obtained in H-SFM consisted of high purity MABs with protein content of 0.94 mg/mL, which did not happen with hybridoma ZEN.2 in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal serum (protein content of 2.06 mg/mL). The ic-ELISA aiming application in quality control was developed with produced MAB, being established for the analysis of total AF: 250 ng/mL of AFB<sub>1</sub>-BSA, 1:10<sup>4</sup> mAb anti-AF (0.094 µg/mL), 1:2000 anti-mouse IgG-HPR and 0.1% BSA for blocking. The standard curve (0 to 5 ng/mL of AFB<sub>1</sub>) presented coefficient of prediction (R<sup>2</sup>) of 0.996 and Pearson's correlation (r) of -0.93. The applicability of MAB for analysis of AF, DON and ZEA in corn was evaluated against matrix interference and recovery. The matrix interference analysis was similar to AF from 1:5 dilution (p> 0.05) with limit of detection (LOD) of 2 and quantification (LOQ) of 4.6 µg/kg, average recovery of 113, 106 and 104% in concentrations of 10, 20 and 40 µg/kg, respectively (coefficient of variation - CV of 6 to 20%). By analyzing AF in 75 corn samples using ic-ELISA and HPLC, it was observed that eight resulted positive by both methods (ratio ELISA/HPLC, 0.8 to 1.2). Five positive samples by HPLC were negative by ic-ELISA due to the difference in the LOD and LOQ. The parameter set for DON analysis by ic-ELISA in corn, wheat and wheat products (biscuit) was: 2 µg/mL of DON-HS-OVA; 1:2000 MAB anti-DON (10.9 µg/mL). The mAb produced by DON.3 hybridoma allowed for analysing biscuit without requiring matrix dilution (LOD of 370 and LOQ of 159.3 µg/kg), i.e. higher sensitivity than obtained for analysis of corn (1:5 dilution; LOD of 302.8, LOQ of 589.3 µg/kg). Recovery of DON in biscuit artificially infected (500, 1000 and 2000 µg/kg) was between 95 to 106% (CV of 3 to 8%) whereas in corn, it was 95-106% (7 to 11% fo CV). Analyzing DON in 29 samples of biscuit by ic-ELISA and HPLC, the correlation coefficient was 0.72 (ratio ELISA/HPLC 0.4 to 15.8). For the same analysis on corn (75), five samples were positive with both techniques,

although 49 samples were quantified by HPLC (LOQ of 30.4 µg/Kg) and 6 samples by ic-ELISA (LOQ of 589.3 µg/Kg). The parameters set for analysis by ZEA ic-ELISA were: 2.5 µg/mL of ZEA-OVA and anti-ZEA MAb 1:200 (10.3 µg/mL). The matrix interference analysis of ZEA in corn (LOD of 51.7 and LOQ of 93.2 µg/Kg) and biscuit (LOD of 9.7 LD and LQ 23.7 of µg/Kg) were similar from the 1:5 dilution ( $p > 0.05$ ), while the wheat required 1:10 dilution (LD of 33.5 and LQ of 87 µg kg). The average recovery in artificially contaminated corn ranged from 98 to 108% (CV 3 to 9%), 97 and 112% for wheat (CV 2 to 8%), and 96 to 102% (CV 4 to 7%) for biscuit. Analysis of ZEA in maize (36 samples) by ic-ELISA and HPLC showed a correlation coefficient of 0.77. Considering the maximum ZEA established by Brazilian legislation, 16 corn samples had levels exceeding 400 µg/Kg for both techniques, although two samples presented different values in the analysis (509.3 vs 218.8 µg/Kg and 388.6 vs. 430.3 µg/Kg, for ic-ELISA vs. HPLC, respectively). Analysis of ZEA in wheat (125) by ic-ELISA and HPLC showed five positive results, while they presented 74 negative samples. Analyzing ZEA in biscuit, 9 samples were tested positive by ic-ELISA (31.3 to 95 µg/Kg), compared to 21 positive by HPLC (0.9 to 92.2 µg/Kg). The ic-ELISA developed with mAb produced in the laboratory (hybridoma AF.2, ZEN.2 and DON.3) showed stability of sensitized microplate at least two weeks at 10 °C confirming the application in the rapid screening of mycotoxins in the food chain.

**Key words:** Hybridoma, monoclonal antibody, immunoassay, mycotoxins, microcystin

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Esquema geral para obtenção de hibridoma produtor de anticorpo monoclonal.....	20
Figura 2 - Reação entre grupo carboxila e amina intermediada por molécula carbodiimida para formação de conjugado hapteno-proteína carreadora.....	22
Figura 3 – Esquema de conjugação utilizando (a) glutaraldeído e (b) éster NHS (b).....	22
Figura 4 – Estrutura de principais aflatoxinas e metabólitos oriundos de biotransformação hepática.....	29
Figura 5 – Estrutura de principais tricotecenos do grupo B.....	32
Figura 6 – Estrutura de Zearalenona e principais metabólitos.....	33
Figura 7- Estrutura química da Microcistina (MC).....	35
Figure 8 - Scheme development of hybridoma for producing monoclonal antibody.....	59
Figure 9 – i-ELISA using mAb against microcystin (M8H5 line), and MC-LR-KLH (a); MC-LR-BSA (b); MC-LR-OVA (c) and their respectively EDPC-protein (negative control) as coating solution.....	60
Figure 10 - First attempt of immunization. Optical density (450 nm) comparison of 6 bleeds by i-ELISA, using as coating solution MC-LR-OVA and EDPC-OVA.....	61
Figure 11 – Second attempt of immunization. Optical density (450 nm) comparison of 3 bleeds by i-ELISA, using as coating solution MC-LR-OVA and EDPC-OVA.....	62
Figure 12 - Amide formation mechanism via carbodiimide.....	63
Figure 13 – ic-ELISA of positive well of cell fusion and serum mouse (positive control).....	63
Figure 14 - ic-ELISA of positive wells (fusion) using (a and b) MC-LR 1µg/mL in buffer 0.1 M carbonate-bicarbonate pH 9.6 as coating or (c and d) MC-LR-KLH (DCC/NHS) 5µg/mL in PBS as coating solution and 1000 ng/mL of MC-LR in PBS as inhibitor.....	64
Figure 15 – ic-ELISA of positive clones using MC-LR-KLH (DCC/NHS) 5 µg/mL in PBS as coating solution and as inhibitor 1000 ng/mL of MC-LR in PBS.....	64-65
Figure 16 – Evaluation of blocking solution in ELISA aiming to select the solution that shows non-specific binding in plate.....	66
Figure 17 - Evaluation of concentration of MC-LR-KLH (1 to 0.05 µg/mL), diluent coating solution (PBS and 0.1 or 0.01M Carbonate/bicarbonate pH9.6 buffer) and diluent antibody solution (PBS, PBS/Tween and blocking solution) for optimization of ELISA.....	67
Figura 18 - Esquema de cultivo celular em meio sintético (H-SFM e RPMI 1640 suplementado com SFB) para produção de anticorpo monoclonal.....	80
Figura 19 - Esquema da purificação de AcM produzido.....	81
Figura 20 – Viabilidade celular durante o início da cultura celular da Linhagem AF.2 produtor de anticorpo monoclonal anti-AF em meio H-SFM suplementado com SFB.....	81
Figura 21 – Eletroforese SDS-PAGE de anticorpo produzido em meio H-SFM pela linhagem AF.2 dialisado.....	82
Figura 22 - Determinação de atividade anti-AFB <sub>1</sub> por i-ELISA dos AcM produzidos por hibridoma linhagem AF2 em meio H-SFM.....	82
Figura 23 – Avaliação da atividade de AcM anti-AFB <sub>1</sub> produzidos em meio H-SFM por ic-ELISA.....	82
Figura 24 – Viabilidade celular durante o início da cultura celular da Linhagem ZEN.2 produtor de anticorpo monoclonal anti-ZEA em meio RPMI 1640 suplementado com SFB.....	83
Figura 25 – Eletroforese SDS-PAGE de anticorpo produzido em meio H-SFM pela linhagem ZEN.2 dialisado.....	83
Figura 26 - Determinação de atividade anti-ZEA por i-ELISA dos AcM produzidos por hibridoma linhagem	

ZEN.2 em meio H-SFM.....	83
Figura 27 – Avaliação da atividade de AcM anti-ZEA produzidos em meio H-SFM por ic-ELISA.....	84
Figura 28 – Teste de reatividade cruzada entre anticorpos e conjugado (toxina-proteína) disponíveis no laboratório.....	84
Figura 29 -Esquema geral de ic-ELISA.....	103
Figura 30 - Extração de milho para ic-ELISA.....	104
Figura 31 - Extração de trigo e biscoito para ic-ELISA.....	104
Figura 32 - Extração de matriz para análise de Aflatoxina por CLAE.....	105
Figura 33 - Extração de matriz para análise de Zearalenona por CLAE.....	105
Figura 34 - Extração de matriz para análise de Desoxinivalenol por CLAE em biscoito.....	106
Figura 35 - Extração de matriz para análise de Desoxinivalenol por CLAE em milho.....	106
Figura 36 – Determinação da concentração ótima de AFB <sub>1</sub> -BSA empregando i-ELISA.....	107
Figura 37 - Determinação da diluição ótima de AcM e IgG anti- <i>mouse</i> -HPR empregando i-ELISA.....	107
Figura 38 – Avaliação de soluções de bloqueio em ic-ELISA para análise de AF.....	108
Figura 39 – ic-ELISA para análise de AF com as soluções selecionadas.....	108
Figura 40 - Diluição de matriz milho visando redução da interferência na determinação de AFs por ic-ELISA.....	108
Figura 41 - Teste de estabilidade de placas sensibilizadas e bloqueadas, e reagentes armazenados a 10 °C durante 4 semanas.....	109
Figura 42 – Eletroforese SDS-PAGE de anticorpo produzido em meio 25 a 50 % de RPMI + 10 % SFB linhagem DON.3 dialisado.....	110
Figura 43 - Diluição de matriz visando redução da interferência na determinação de DON por ic-ELISA, (a) matriz Biscoito, (b) matriz Milho.....	110
Figura 44 - ic-ELISA para análise de DON com as soluções selecionadas.....	111
Figura 45 - Teste de estabilidade de placas sensibilizadas e bloqueadas, e reagentes armazenados a 10 °C durante 4 semanas.....	111
Figura 46 - Determinação da concentração ótima de ZEA-OVA empregando i-ELISA.....	112
Figura 47 – Avaliação de soluções de bloqueio em ic-ELISA para análise de ZEA.....	112
Figura 48 – ic-ELISA para análise de ZEA com as soluções selecionadas.....	112
Figura 49 - Diluição de matriz visando redução da interferência na determinação de ZEA por ic-ELISA, (a) matriz Milho, (b) matriz Trigo e (c) matriz Biscoito.....	113
Figura 50 – Teste de estabilidade de placas sensibilizadas e bloqueadas, e reagentes armazenados a 10 °C durante 4 semanas.....	114
Figura 51 - Correlação de resultados obtidos por ic-ELISA e CLAE em 29 amostras de biscoito.....	116
Figura 52 - Correlação de resultados obtidos por ic-ELISA e CLAE em 36 amostras de milho.....	116

## LISTA DE TABELAS

Table 1 – Protein concentration of MC-LR-protein (BSA, OVA and KLH) and the respective negative controls measured by BCA assay.....	60
Table 2 – Evaluation of solutions (0.5% gelatin, 3% skim milk and 0.1%OVA in PBS) for reduction of the non-specific binding of the plate in ELISA.....	63
Table 3 – Cell viability and activity against MC-LR of selected clones in HT medium and GIT medium.....	65
Table 4 - Cell viability and activity against MC-LR of selected clones in HY medium and GIT medium.....	65
Table 5 – Viability of cloned cell, concentration of live cell, number of days when the cells was count after thawed and the number of times that the clone was thawed.....	66
Table 6 – Comparison of development of color system, horseradish peroxidase (HPR) with TMBZ or alkaline phosphatase (ALP) with pnPP.....	67
Tabela 7 – Reatividade cruzada com análogos de aflatoxinas do AcM produzido pela linhagem AF.2.....	70
Tabela 8 – Reatividade cruzada com análogos de zearalenona do AcM produzido pela linhagem ZEN.2 .....	71
Tabela 9 - Recuperação de AFs (AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub> ) em matrizes alimentares contaminados artificialmente.....	109
Tabela 10 – Otimização de ic-ELISA para detecção de DON em trigo.....	110
Tabela 11 - Recuperação de DON em matrizes alimentares contaminados artificialmente.....	111
Tabela 12 - Recuperação de ZEA em matrizes alimentares contaminados artificialmente.....	113
Tabela 13 – Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de AFs em 75 amostras de milho.....	114
Tabela 14 – Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de DON em 75 amostras de milho.....	115
Tabela 15 - Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de DON em 56 amostras de biscoito.....	115
Tabela 16 – Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de ZEA em 75 amostras de milho.....	116
Tabela 17 - Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de ZEA em 125 amostras de trigo.....	117
Tabela 18 - Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de ZEA em 56 amostras de biscoito.....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
AcM ou mAb	Anticorpo Monoclonal
AF ou AFs	Soma de Aflatoxina (B1, B2, G1, G2)
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B1
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B2
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G1
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G2
Ag-Ac	Antígeno-Anticorpo
ALP-anti-mouse IgG	Conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fofatase alcalina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCA	Ácido Bicinconínico ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina de soro bovino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	(N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluenesulfonate))
CV	Coefficiente de variação
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMF	N,N-Dimethylformamide
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DON	Desoxinivalenol, <i>deoxynivalenol</i>
DON-HG-OVA	DON- Hemissuccinato-Ovoalbumina
DON-HS-OVA	Desoxinivalenol-Hemissuccinato-Ovoalbumina
EDPC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N- ethylcarbodiimide hydrochloride
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FCA	Adjuvante de Freund completo ( <i>Freund's Adjuvant Complete</i> )
FIA	Adjuvante de Freund incompleto ( <i>Freund's Adjuvant Incomplete</i> )
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina
HPRase	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase
HRP	Horseradish peroxidase
H-SFM	Meio <i>Hybridoma-SFM</i> (serum free medium)
HT	Hipoxantina-timidina
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
i-ELISA	ELISA indireto ( <i>indirect enzyme linked immunosorbent assay</i> )
ic-ELISA	ELISA competitivo indireto ( <i>indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay</i> )
IgG	Imunoglobulina G
IgG anti-mouse-HPR	Conjugado anti-IgG de camundongo marcado com horseradish peroxidase
IL-6	Interleucina-6
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
LD	Limite de detecção do método
LD50	Dose letal mediana ( <i>lethal dose, 50%</i> )
LQ	Limite de quantificação
MC-LR	Microcistina lisina-arginina
MC	Microcistinas
NEAA	Aminoácidos não essenciais
NHS	N-Hidroxisuccinimida (N-Hydroxysuccinimid)
O.D.	Densidade óptica ( <i>Optical density</i> )
OMS ou WHO	Organização Mundial de Saúde
OTA	Ocratoxina A
OVA	Ovoalbumina
PBS	Tampão fosfato de sódio salina
PBST	Tampão fosfato de sódio salina- com Tween 0,05%
PDA	Photodiode Array (Arranjo de fotodiodo)
PEG 8000	Poliétileno glicol 8000
PMTDI	Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória ( <i>Provisional Maximum Tolerable Daily Intake</i> )
pNPP	4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliácridamida ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SFB	Soro fetal bovino
TDI	Dose diária tolerável ( <i>Tolerable Daily Intake</i> )
TFA	Ácido trifluoroacético
TK	Timidina quinase (TK)
TMB ou TMBZ	3, 3', 5, 5'- Tetrametilbenzidine
ZEA	Zearalenona

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Hibridoma e anticorpo monoclonal.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1. Conjugado imunogênico .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.2. Imunização.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.3. Fusão celular.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.4. Seleção e clonagem celular .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.5. Cultivo celular .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Método imunoenzimático para detecção de micotoxinas .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3. Micotoxinas e cianotoxinas .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1. Aflatoxinas .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2. Desoxinivalenol.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.3. Zearalalenona .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3.4. Microcistina .....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 1: HYBRIDOMA GENERATION: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST MICROCYSTIN.....</b>	<b>39</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>39</b>
<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>40</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-MICOTOXINA (AFLATOXINA E ZEARALENONA) UTILIZANDO LINHAGEM AF.2 E ZEN.2 .....</b>	<b>68</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>68</b>

<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 3: ELISA COMPETITIVO INDIRETO PARA ANÁLISE DE AFLATOXINAS, DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM DIFERENTES ALIMENTOS .....</b>	<b>85</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>102</b>
<b>4. CONCLUSÃO FINAL .....</b>	<b>118</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>128</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>135</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país produtor de destaque, com perfil exportador agropecuário em pleno crescimento no mundo globalizado, com participação relevante do Estado do Paraná na produção de soja, milho, trigo, café, feijão, aves de corte, entre outros (IBGE, 2011; CONAB, 2013). O atual interesse econômico brasileiro, centralizado em agronegócio, não deve omitir os cuidados perante segurança alimentar, que constitui a base da proteção de saúde humana e animal. Assim, além de garantia na produção nacional de matéria-prima e produtos derivados contra resíduos tóxicos, a vigilância também deve assegurar a qualidade de produtos importados disponibilizados à população.

Considerando que fungo seja o principal agente de doença em plantas, micotoxinas constituem perigo natural de maior frequência na cadeia produtiva de alimento. Uma vez produzidos, estes metabólitos secundários persistem ao longo de cadeia alimentar, expondo o consumidor ao perigo de intoxicação em dose aguda e, efeito crônico em decorrência exposição prolongado, com ênfase a carcinogênese, teratogênese e imunossupressão.

Soma-se ainda, o impacto da deterioração de água devido ao desenvolvimento acelerado sem consciência logística, acoplado à demanda crescente de recursos hídricos. A eutrofização d'água resultante da lixiviação de solo fertilizado pela agricultura, atividades urbanas, industriais e piscicultura contaminam o meio ambiente e, causam a proliferação exacerbada de cianobactérias tóxicas, com conseqüente produção de microcistinas (MC).

A ocorrência natural de fungos e cianobactérias toxigênicos sob intenso sistema agropecuário brasileiro em avanço é um fato inevitável. Não obstante, a exposição humana e animal a toxinas naturais podem ser minimizados, sendo o monitoramento contínuo o procedimento preventivo de escolha.

Em paralelo ao desenvolvimento de metodologia analítica avançada de alta sensibilidade e especificidade, a advinda de inovação tecnológica baseado em método rápido confiável de alta precisão e econômico, acoplado à facilidade no uso, tem despontado como critério decisivo e crucial no controle de qualidade do setor produtivo, assim como na vigilância de saúde pública. A imunquímica se destaca entre bioferramenta de escolha para a detecção *in loco* de toxinas, sendo o anticorpo monoclonal – AcM, o alicerce biológico na tecnologia de ponta, capaz de assegurar o extensivo e abrangente monitoramento perante triagem de contaminação de micotoxinas e cianotoxinas.

A química analítica isenta de solventes tóxicos e equipamentos sofisticados tem sido a meta de imunobiotecnologia aplicada ao controle de resíduos, protegendo os analistas e evitando a contaminação ambiental. Estas biotecnologias emergentes para resíduos tóxicos dependem de anticorpos extremamente selecionados, assim como da produção irrestrita de AcM oriundo de hibridoma.

O presente trabalho visa desenvolvimento de hibridoma para produção de anticorpo monoclonal - AcM contra molécula não-imunogênica de baixa massa molecular, proliferação celular para produção de AcM, à padronização – otimização de imunoensaio indireto competitivo ic-ELISA. I.e., desenvolvimento de métodos rápidos altamente específicos, indispensáveis na segurança e qualidade da cadeia produtiva de alimentos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Hibridoma e anticorpo monoclonal

A técnica de hibridoma desenvolvida por Köhler e Milstein (1975) permitiu a produção ilimitada de anticorpo monoclonal (AcM) caracterizado pela alta especificidade, uniformidade e afinidade constante a um único epítipo. O hibridoma é gerado pela fusão de esplenócitos secretores de Ac com célula de mieloma (TIZARD, 1995; ROITT et al., 1999) (Figura 1).

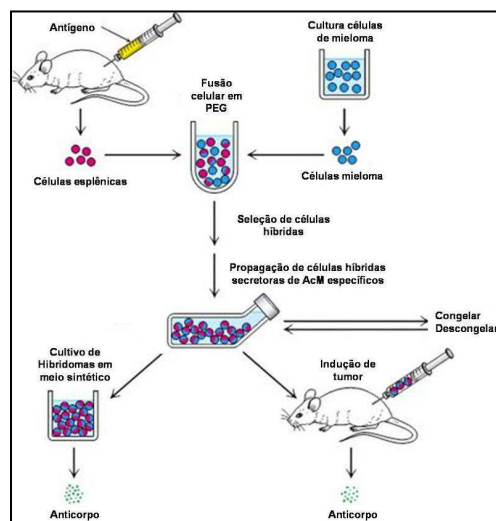


Figura 1 – Esquema geral para obtenção de hibridoma produtor de anticorpo monoclonal (Fonte: BERG et al., 2002).

Para obter um hibridoma para produção de AcM contra hapteno, o pesquisador necessita ter conhecimento multidisciplinar, visto que é um trabalho laborioso em que envolve preparo do conjugado (proteína-antígeno); imunização de animal; fusão de células esplênicas do animal imunizado com células de mieloma; seleção celular; clonagem; e adaptação em meio de cultura para produção de AcM.

#### 2.1.1. Conjugado imunogênico

A fim de produzir AcM de moléculas pequenas (haptenos), o uso de proteína carreadora para imunização é eficaz. A escolha da proteína carreadora depende do hapteno e disponibilidade, sendo usualmente, *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH), albumina do soro bovino (BSA), ovalbumina (OVA)

e seus derivados cationizada, albumina do soro de camundongo e albumina do soro de coelho (LERNER, 1981; HARLOW e LANE, 1988; HERMANSON, 2008)

KLH apresenta vantagem por ser uma molécula grande de massa molecular entre  $4,5 \times 10^5$  a  $1,3 \times 10^7$ , contendo vários grupos funcionais para conjugação (1 mol contém mais de 2000 resíduos de lisina, 700 grupos sulfidril e 1900 tirosinas) (HERMANSON, 2008). BSA apresenta alta solubilidade e resíduos de 30 a 35 lisina disponíveis para acoplamento, além de 19 tirosinas, 35 cisteínas, 39 ácido aspárticos e 59 ácidos glutâmico. OVA é uma apropriada escolha como conjugado do teste de seleção de hibridoma, com 20 resíduos de lisinas, 14 ácidos aspártico e 33 grupos de ácidos glutâmico (HERMANSON, 2008).

A reação de acoplamento entre hapteno e proteína carreadora é outra importante etapa para sucesso da geração de hibridoma. A presença de grupo amino, sulfidril, fenólico ou ácido carboxílico no antígeno são utilizados para ligação com as proteínas.

A Via de Carbodiimida para conjugação emprega a ligação entre grupo carboxila (-COOH) e grupo amina (-NH<sub>2</sub>). Esta via é uma das reações mais utilizadas para conjugação, devido a eficiência na formação de conjugados entre duas moléculas de proteínas, entre um peptídeo e uma proteína, entre um oligonucleotídeo e uma proteína, entre um biomolécula e uma superfície ou partícula, ou qualquer combinação destes com pequenas moléculas (Figura 2) (LERNER, 1981; HARLOW e LANE, 1988; HERMANSON, 2008; JOULLIÉ e LASSEN, 2010). Uma das desvantagens dessa conjugação é desvio da rota de formação de amida para formação de N-acilureia a partir da molécula intermediária o-acilisourea, reduzindo a taxa de ligação entre hapteno e proteína. (JOULLIÉ e LASSEN, 2010 HERMANSON, 2008).

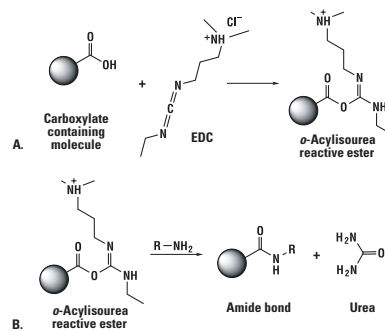


Figura 2 - Reação entre grupo carboxila e amina intermediada por molécula carbodiimida para formação de conjugado hapteno-proteína carreadora. (Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2009).

Outra via de conjugação é a do Glutaraldeído, em que reage com grupo de amina primária gerando produto base de Schiff ou dupla ligação (tipo Michael) (Figura 3a). A reação envolve principalmente grupos  $\epsilon$ -amino da lisina e  $\alpha$ -amino N-terminal. A via éster de N-Hidroxissuccinimida (NHS) é altamente reativa para aminas em proteínas e outras moléculas para formar ligações de amida estáveis, sendo muitas vezes usada junto com molécula de carbodiimida (Figura 3b) (HERMANSON, 2008).

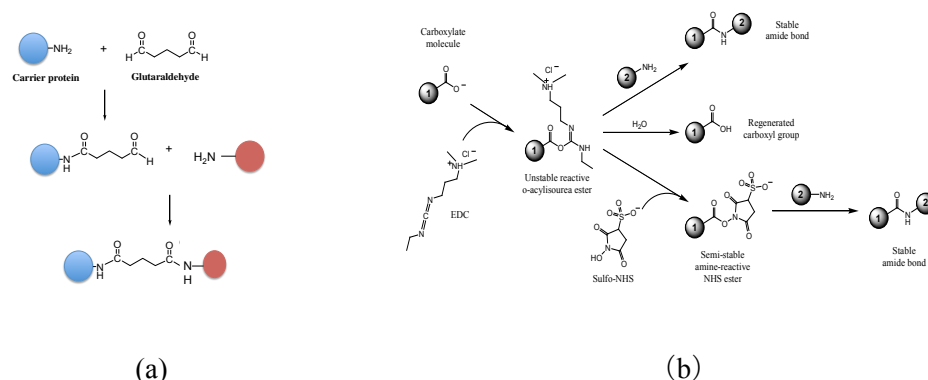


Figura 3 – Esquema de conjugação utilizando (a) glutaraldeído e (b) éster NHS (Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2009).

### 2.1.2. Imunização

A espécie do animal, quantidade de conjugado injetado, via de injeção, quantos reforços e uso de adjuvantes são também elementos para definir visando o sucesso da obtenção de hibridoma. Em geral, camundongos (fêmeas BALB/c se não há preferência) ou ratos são empregados nos experimentos; a dose de imunização é calculada com conhecimento da dose letal (LD50) do antígeno;

via de injeção é subcutâneo, intraperitoneal ou intravenoso; na terceira injeção de conjugado obtém alto título de anticorpo contra antígeno no soro; e uso de adjuvante auxilia na indução de maior resposta contra antígeno.

### **2.1.3. Fusão celular**

A produção de anticorpo monoclonal envolve a fusão de células de mieloma com células esplênicas e seleção de células híbridas (hibridoma), com auxílio de Polietileno glicol que funde as membranas do mieloma com da célula esplênica, formando célula com dois ou mais núcleos (HARLOW e LANE, 1988).

A cultura da fusão é realizada em meio suplementado com hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT). Aminoptericina bloqueia a síntese de DNA pela inibição da enzima dihidrofolato redutase. Células deficientes que não utilizam via de salvação para síntese de nucleotídeos são eliminados (células de mieloma) e células que possuem enzimas hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HPRTase) e timidina quinase (TK) podem utilizar via de salvação se suplementado hipoxantina e timidina (células híbridas) (LERNER, 1981; HARLOW e LANE, 1988; CANDLISH, SMITH e STIMSON, 1989).

O meio suplementado com HAT proporciona a morte seletiva de células de mieloma não fundida e elimina hibridomas mieloma-mieloma que não possuem a enzima HPRTase. Embora células esplênicas possuem HPRTase, a sua viabilidade *in vitro* é de curta duração (LERNER, 1981; HARLOW e LANE, 1988; CANDLISH, SMITH e STIMSON, 1989).

Usualmente, durante a seleção de células produtoras de anticorpo contra antígeno, aminoptericina é removido do meio e células são cultivadas em meio suplementadas com hipoxantina-timidina (HT) e em seguida adaptadas para meio para crescimento de hibridoma (HARLOW e LANE, 1988).

O meio de cultura para fusão celular, além de antibióticos, tampão e fatores de crescimento, requer nutrientes extras. Embora células de mamíferos possam sintetizar aminoácidos não essenciais (NEAA – alanina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, prolina, serina), a suplementação de NEAA em meio de cultura promove rápido crescimento e aumenta um adequado metabolismo celular, auxiliando no cultivo *in vitro* (HARLOW e LANE, 1988).

NCTC-109 é composto de Tween ® 80, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, co-enzimas (DPN, CoA, TPN, FAD, UTP, TPP) e agentes redutores, tais como a glutatona, ácido ascórbico e a L-cistina. NCTC-109 foi desenvolvido como meio sem proteína para cultivo celular de L-929 de camundongo, sendo também adequado para crescimento de linhagens de hibridomas (LERNER, 1981; HARLOW e LANE, 1988).

Outro importante componente para sucesso de hibridoma é o uso de interleucina-6 (IL-6) que tem sido relatado como estimulador de proliferação celular de hibridoma (MARUSICH, 1988; MAKISHIMA et al., 1992).

#### **2.1.4. Seleção e clonagem celular**

A seleção celular do híbrido produtor de anticorpo contra antígeno específico é executado rapidamente, geralmente por imunoenaios. Após selecionar o híbrido produtor de anticorpo específico, a etapa de clonagem é fundamental para assegurar cultivo celular para possível contaminação ou acidente; também devido ao híbrido ser instável no momento, podendo existir uma colônia de célula não produtora de anticorpo que facilmente cresce em excesso; e por fim, para averiguar se existe múltiplas atividades no poço da colônia celular (LERNER, 1981).

#### **2.1.5. Cultivo celular**

Anteriormente, a produção em massa de AcMs era conseguida inoculando hibridomas selecionados em cavidade ascítica de rato ou camundongo. A prática de tecnologia *in vitro* ocorreu

pela preocupação ética, assim como reduz a necessidade de pessoas com experiência em manejar animais. (ILAR, 1999; HEILMANN et al., 2005). Métodos *in vivo* para produção de AcMs aumentam a preocupação, causam dor e sofrimento nos animais, além de conter proteínas animais e outros contaminantes, requerendo etapas de purificação (ILAR, 1999).

O potencial de produção em larga escala de AcM destinado a aplicação visando diagnóstico, terapia e outros interesses tecnológicos estimulou a melhoria do processo baseado no cultivo de hibridoma em meio artificial (TINTÓ et al., 2002.; BIRCH & RACHER, 2006), sendo uma opção economicamente viável e segura a produção em grande escala (mais de 100 mg de AcM) no sistema de produção *in vitro* (ILAR, 1999).

Geralmente, cultivo celular é realizado em meios-base suplementados com soro fetal. Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) e RPMI 1640 são exemplos de meios-base para cultivo celular constituído de vitaminas, aminoácidos, glucose, sais e indicador de pH. Eles não contêm proteínas ou agentes promotores de crescimento.

O soro animal ainda é adicionado no meio de cultura para dar suporte a multiplicação de diversos tipos celulares visando produção de AcM. O soro fetal bovino (FBS) confere fatores hormonais de estimulação e proteínas para transporte de hormônios, minerais, lipídios, entre outros (AYBA e IMIR, 2000; LEGAZPI et al., 2005; EVEN et al., 2006).

A técnica de cultivo celular pode ser aperfeiçoada pela remoção completa de soro animal do meio de cultura. Meio livre de soro geralmente é composto de meio base (MEMO, DMEM, F12, RPMI 1640 ou mistura) com suplementos. Os suplementos incluem fatores de crescimento como hormônios, proteínas, aminoácidos, assim com agentes protetores, como polietileno glicol.

Meio livre de soro apresenta vantagens de serem quimicamente definidos, minimizando risco com meio originado de animais, além de diminuir período de adaptação celular. Entre os meios livres

de soro, meio Hybridoma-SFM (H-SFM) é amplamente utilizado para crescimento e produção de anticorpo em várias linhagens de hibridomas. H-SFM exibe baixa concentração de proteína (20 µg/mL de insulina e transferrina), fornece benefícios técnicos e segurança, já que reduz a probabilidade do perigo de contaminação oriundo de material biológico como príon, vírus e micoplasma. Sendo meio de composição definida, permite controle de multiplicação celular, facilita purificação de AcM por conter menor teor de componentes interferentes, diminuindo o custo de imunorreagente produzido (LEGAZPI et al., 2005; EVEN et al., 2006).

A produção de AcM tem permitido o desenvolvimento de métodos imunoquímicos, como ELISA, que é uma alternativa para análise de triagem de micotoxinas em amostras, visando minimizar o custo e tempo de análise no controle e segurança em alimentos.

## **2.2. Método imunoenzimático para detecção de micotoxinas**

Os imunoenaios constituem ferramentas bioanalíticas de abrangência universal, seja na área de ciências básicas como aplicada, sendo indispensável no diagnóstico clínico, cuja utilidade se estendeu para outras áreas como biotecnologia, ciência de alimentos, incluindo análise, microbiologia, nutrição, controle de qualidade e de processo (FUJII, 2007).

Entre os métodos imunoquímicos, o ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) se destaca entre os pioneiros na detecção rápida visando análise rotineiro de micotoxinas (ANKLAM et al., 2002; CALLERI, 2006; XIULAN et al., 2006). Diversos imunoenaios ELISA têm sido comercialmente disponibilizados para uma variedade de micotoxinas, incluindo detecção de aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenona, desoxinivalenol, citrinina e toxina T-2 (PITTET, 2005; KRKA et al., 2008). Método de ELISA é uma alternativa simples e econômica a métodos instrumentais químicos em constante avanço, sendo indicado para a triagem

rápida na análise de micotoxinas em matrizes alimentares (KOLOSOVA et al., 2006; PRIETO-SIMÓN et al., 2007).

A imensa variabilidade de reagentes comerciais depende da qualidade de Ac selecionado para a obtenção do imunorreagente; portanto, especificidade, sensibilidade e reatividade-afinidade de Ac destinado à produção de kits contra mesma micotoxina varia conforme grupo técnico-científico responsável pela inovação e desenvolvimento para a Empresa.

A baixa complexidade e massa molecular de micotoxinas conferem baixa imunogenicidade, deste modo, são incapazes de estimular o sistema imune isoladamente. Não obstante, as micotoxinas precisam ser conjugadas covalentemente a uma proteína carreadora para se tornarem imunógenas. Assim, T-2 toxina, ocratoxina, citrinina e aflatoxina apresentando diferentes grupos funcionais resultam em diferentes ligações químicas a moléculas carreadoras (CHU & UENO, 1977; XIAO et al., 1995).

A modalidade de ELISA indicada para proceder à determinação de micotoxinas seria o competitivo indireto (ic-ELISA), cujo protocolo de ensaio requer somente um Ac específico (FUJII et al., 2004). O princípio de ic-ELISA fundamenta-se na competição entre micotoxina presente na amostra com a toxina imobilizada na microplaca, perante o mesmo sítio específico do Ac. A concentração de toxina na amostra é indiretamente quantificada pela reação procedente de Ac específico anti-micotoxina absorvido à superfície sensibilizada, que atua como sítio de ligação ao anti-IgG (Ac secundário) marcado com enzima, responsável pela reação colorimétrica.

As principais vantagens de imunoensaio são a especificidade na detecção - devido à seletividade de ligação anticorpo-antígeno, rapidez, simplicidade e adaptabilidade; sendo a reação realizada numa microplaca com capacidade de análise simultânea para dezenas de amostras (LEE et al., 2004; SAHA et al., 2007; KRŠKA et al., 2008). Além disso, a maioria dos protocolos não requer

uma limpeza de amostras após diluição do extrato e/ou filtração antes da análise (PITTET, 2005).

Entretanto, as limitações consistem na manutenção da integridade estrutural de Ac utilizado, já que se tratando de proteína, a desnaturação pode resultar em baixa reprodutibilidade, devido a perda de afinidade específica; somam-se ainda a possibilidade de resultado falso-positivo devido à reação cruzada, i.e. ligação do Ac com constituintes interferentes e/ou inibição da atividade da enzima dependendo de matrizes alimentares, implicando na necessidade de procedimentos confirmatórios (ANKLAM et al., 2002; LEE et al., 2004; PITTET, 2005; CALLERI et al., 2006; PRIETO-SIMÓN et al., 2007; CHO et al., 2008). A interferência de matriz pode ser minimizada procedendo diluição prévia do extrato, ou incluir processo de limpeza antes do ensaio (ONO et al., 2000; FUJII, 2002).

### **2.3. Micotoxinas e cianotoxinas**

A contaminação por micotoxinas e cianotoxinas é um assunto relevante na segurança da cadeia alimentar devido ao efeito tóxico a saúde humana e dos animais (WATANABE et al., 1989; CARMICHAEL, 1995; AZEVEDO et al., 2002; SAHA et al., 2007; TAVČAR-KALCHER, et al., 2007). As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos em condições específicas (como umidade, temperatura, injúria da matéria-prima, condições de armazenamento) sendo persistentes na etapa de armazenamento, assim como resistem ao processamento, constituindo num perigo natural de maior frequência na cadeia produtiva de alimento (ANKLAM et al., 2002; TAVČAR-KALCHER, et al., 2007; MUSCARELLA et al., 2007; GORYACHAVA et al., 2007). As cianobactérias toxigênicas produzem cianotoxinas, sendo relevante as hepatotoxinas peptídicos cíclicos e neurotoxinas alcalóides. Em ambientes de água doce, a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* é comumente encontrada (SIVONEN et al. 1992, LUUKKAINEN et al., 1993).

#### **2.3.1. Aflatoxinas**

Dentre as micotoxinas, o grupo de aflatoxinas (AFs) produzido principalmente por *Apergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* destaca-se, não somente pela maior toxidez, mas também pelo perigo de produção, desde o estágio de campo, colheita, secagem, processamento e armazenagem (CARLSON et al., 2000; JAIMEZ et al., 2000; CHIAVARO et al., 2001; CHO et al., 2008; DORNER, 2008; LI et al., 2009). Existem mais de 20 análogos de AFs, sendo os principais B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> conforme ocorrência e patogenia. Os metabólitos derivados, resultante da biotransformação hepática de AFB, a exemplo de AFM<sub>1</sub> e AFM<sub>2</sub>, são detectados em leite e outros fluidos orgânicos (Figura 4) (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

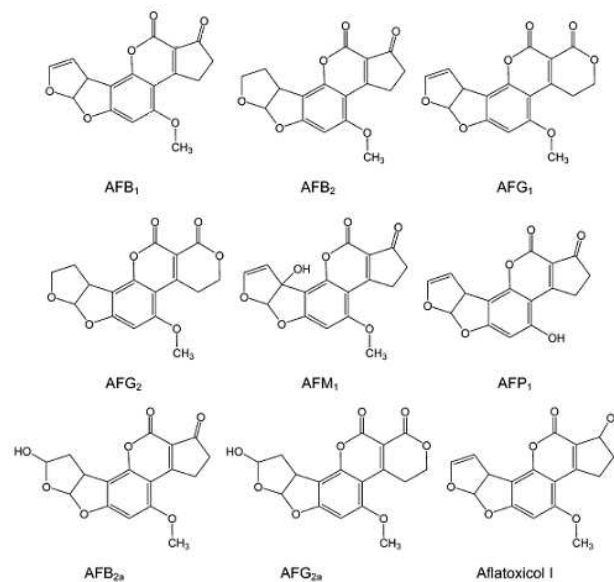


Figura 4 - Estrutura de principais aflatoxinas e metabólitos oriundos de biotransformação hepática (Fonte: LEE, et al., 2004).

AFs são bisfurano cumarinas derivadas de decacetídeo, sintetizada pela via de policetídeos. A série G difere quimicamente da série B pela presença do anel 3-lactona, ao invés do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação entre carbono 8 e 9 ocorre como vinil éter no terminal de anel furano em AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>, mas não em AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>. Essa pequena diferença estrutural afeta

drasticamente a atividade, aumentando a carcinogenicidade e toxidez de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> em relação aos respectivos análogos AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> (JAIMEZ et al., 2000).

A conjugação e rigidez estrutural de aflatoxina conferem característica natural de fluorescência, sendo que as denominações B e G decorrem de emissão em azul (*blue*, emissão cerca de 440 nm) e verde (*green*, a 460 nm), respectivamente, sob exposição à luz ultravioleta (360-365 nm).

A AFB<sub>1</sub> é a mais tóxica do grupo, classificada pela *International Agency for Research on Cancer* no Grupo 1, i.e. carcinógeno ao humano (IARC, 2002). A toxidez se manifesta pela mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, dependendo da dose e tempo de exposição (COULOMBE, 1993; CARLSON et al., 2000; JAIMEZ et al., 2000; CHIAVARO et al., 2001; EDINBORO & KARNES, 2005; BINDER et al., 2007).

A biotransformação de AFB<sub>1</sub> (MM=312 g/mol) é mediada principalmente pelo citocromo p-450 microsomal intra e extrahepática, embora haja outras conversões. A detoxicação hepática consiste em formação de metabólitos hidroxilados como AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub>, AFB<sub>2a</sub> com potencial mutagênico inferior à AFB<sub>1</sub>; em contraste, a ativação de AFB<sub>1</sub> gera AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido altamente instável e reativo (COULOMBE, 1993; ORSI et al., 2007).

A ação carcinogênica e mutagênica de AFB<sub>1</sub> decorre de alta afinidade eletrofilica e reatividade de AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido a nucleófilos celulares como DNA, com ataque nucleofílico ao átomo N<sup>7</sup> de guanina (GROOPMAN et al., 1984; COULOMBE, 1993). AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido pode ser enzimaticamente inativada por glutathiona (GSH), sendo uma importante via de detoxicação em várias espécies animais. Vias de conjugação com sulfato e ácido glicurônico também participam na detoxicação, sendo excretado através de urina (COULOMBE, 1993).

Agências governamentais têm estabelecido rigorosos programas para regulamentar os níveis de AFs permitidos em alimentos e rações, visando evitar exposição humana (AKIYAMA et al., 2001;

XIULAN et al., 2006; VAN EGMOND et al., 2007). O limite de tolerância para AF varia conforme país importador ou exportador, blocos comerciais, bem como matrizes alimentares (ANKLAM et al., 2002).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA regulamentou o limite máximo tolerável de AF total ( $B_1+B_2+G_1+G_2$ ) em 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para milho, especiarias, amendoim e derivados; 5,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para cereais e produtos a base de cereais, exceto milho e derivados, e produtos de cacau e chocolate; 10,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para frutas desidratadas e secas; 0,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para  $\text{AFM}_1$  em leite fluído; 5,0  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para leite em pó; 2,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para queijos (BRASIL, 2011).

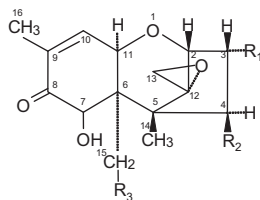
A Comunidade Europeia estabeleceu limite de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para  $\text{AFB}_1$  e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para soma de aflatoxinas ( $B_1+B_2+G_1+G_2$ ) em milho, espécies de pimenta, e avelãs e castanhas do Brasil; 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para  $\text{AFB}_1$  e 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para AFS em amendoim para consumo, frutas secas e alguns cereais. Para espécies de pimenta, decretou tolerância de  $\text{AFB}_1$  em 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para AFs totais; 0,05ng/L para  $\text{AFM}_1$  no leite cru, tratado termicamente e para processamento (COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA, 2006).

### **2.3.2. Desoxinivalenol**

Micotoxinas pertencentes ao grupo de tricotecenos são designados quimicamente como sesquiterpenóides, contendo anéis cíclicos com uma dupla ligação entre as posições C9 e10, um anel epóxido na posição C12 e13. Mais de 200 tricotecenos foram identificados e são divididos em quatro grupos, tendo maior importância o grupo A (toxina T-2 e HT-2) e grupo B, representada principalmente por desoxinivalenol (DON) e nivalenol (RAN et al., 2013).

Desoxinivalenol (DON) (MM=296 g/mol) (Figura 5) é uma das micotoxinas mais detectada nos grãos de cereais, comumente em trigo, milho, centeio, arroz, aveia e cevada. O tricotecenos são

produzidos por diversas espécies de *Fusarium*, principalmente, *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* (MARTINS e MARTINS, 2002; PESTKA, 2007)



Toxin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH
4-acetyl nivalenol (Fusarenone-X)	OH	OCOCH <sub>3</sub>	OH
3-acetyl DON	OCOCH <sub>3</sub>	H	OH
15-acetyl DON	OH	H	OCOCH <sub>3</sub>

Figura 5 – Estrutura de principais tricotecenos do grupo B (Fonte: Döll e Dänicke, 2011).

DON é considerado um potente inibidor de síntese proteica de células eucariontes. Efeitos adversos à saúde como redução do consumo de alimentos, vômitos, perda de peso, diarreia, disfunção imunológica em animais expostos a DON tem sido associado (MARTINS e MARTINS, 2002; PESTKA, 2007; KUZDRALINSKI, SOLARSKA e MUSZYNSKA, 2013). DON é classificado pela *International Agency for Research on Cancer* no Grupo 3, isto é, não carcinogênico para humanos (IARC, 1993), e a Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória (PMTDI) foi estabelecida em 1 µg/kg de peso corporal (JECFA, 2002).

O sistema gastrointestinal e a microflora do rúmen desempenham papel importante na detoxicação de DON. Estudos com animais relevaram que DON é metabolizado em todas as espécies, não sendo bioacumulado. Assim, os resíduos desta toxina no leite, carne e ovos de animais produtores de alimentos não são de importância para a saúde animal ou humana (PESTKA, 2007)

A legislação brasileira decretou que até 2016, o limite máximo de 1000 µg/Kg para trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada, e 500 µg/Kg para farinha de trigo, derivados de trigo e cereais exceto trigo (BRASIL, 2011).

A comunidade europeia estabeleceu limite máximo tolerável de 1750 µg/Kg para milho e trigo não processados, 1250 µg/Kg para outro cereais não transformados, além de decretar valores

máximos para farinha (750  $\mu\text{g/Kg}$ ), pães, produtos de pastelaria, bolachas à base de cereais (500  $\mu\text{g/Kg}$ ) (COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA, 2007).

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) propuseram a elaboração de limite máximo de DON de 2000  $\mu\text{g/Kg}$  para trigo, milho e cevada; de 1000  $\mu\text{g/Kg}$  para derivados de trigo, milho e/ou cevada; e alimentos infantis a base de cereais de 500  $\mu\text{g/Kg}$  (CX/CF 12/6/9, 2012).

### 2.3.3. Zearalenona

Zearalenona (ZEA) (MM=318 g/mol), conhecido como F-2 toxina, é uma micotoxina estrogênica não esteróide sintetizado pela via das policetidas por fungos do género *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. verticillioides*. *F. graminearum*. Também produz tricotecenos como DON, 15-acetil-DON, 3-acetil-DON, nivalenol e fusarenona X. Além de ZEA, vários metabólitos foram relatados em culturas de fungos, como  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol e  $\beta$ -zearalanol (Figura 6) (MARTINS e MARTINS, 2002; KUZDRALINSKI, SOLARSKA e MUSZYNSKA, 2013).

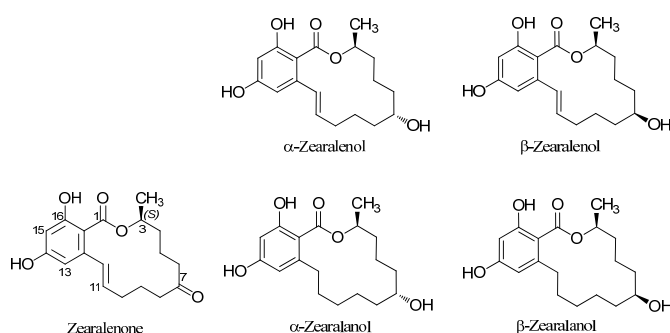


Figura 6 – Estrutura de Zearalenona e principais metabólitos (EFSA, 2011).

ZEA e derivados foram relatados principalmente em milho e derivados, também ocorrendo em cevada, aveia, trigo e derivados, sorgo e arroz. Fungos produtores de zearalenona infectam o grão, principalmente no campo, podendo ocorrer em condições de inadequadas de armazenamento.

ZEA é conhecido por sua atividade estrogênica, por ligar aos receptores de estrógeno de mamíferos e induz efeitos estrogênicos, principalmente em suínos. Os fetos e recém-nascidos são mais sensíveis aos efeitos estrogênicos de zearalenona do que os adultos, devido à imaturidade metabólica e fisiológica.

ZEA é classificada no Grupo 3, não carcinogênico para humanos (IARC, 1993) e a ingestão diária máxima tolerável provisória (PMTDI) foi estabelecida em 0,5 µg/kg de peso corporal (JECFA, 2000).

ZEA é amplamente absorvida e metabolizada por redução enzimática da ZEA, resultando na formação de  $\alpha$ -zearalenol e  $\beta$ -zearaleno. Assim como, ZEA é também monohidroxilados por citocromos P450, ocorrendo formação de catecóis que podem ser oxidados em quinonas que se submetem ao ciclo redox (BRAVIN et al, 2009; PFEIFFER et al, 2009); também podem ser conjugados com o ácido glucurônico e sulfatos. A detoxicação da zearalenona ocorre no intestino delgado e no fígado que reduzem significativamente as quantidades de moléculas através da glicuronidação (PFEIFFER et al., 2010).

A legislação brasileira decretou que até 2014, o limite máximo de 400 µg/Kg para milho em grão e trigo para posterior processamento, e para ano de 2016, limite de 200 µg/Kg para trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo, e 100 µg/Kg para farinha de trigo, derivados de trigo (BRASIL, 2011).

A comunidade europeia estabeleceu limite máximo tolerável de 350 µg/Kg para milho não processado, 100 µg/Kg para outros cereais não transformados; e 50 µg/Kg para pães, produtos de pastelaria, bolachas à base de cereais (COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA, 2006).

### 2.3.4. Microcistina

As microcistinas (MC) são metabólitos secundários produzidos por cianobactérias filamentosas (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*) e colonial (*Microcystis*) (CARMICHAEL, 1995;. LUUKKAINEN et ai, 1993), sendo toxinas heptapeptídicos cíclicos (Figura 7). As variações estruturais têm sido relatadas em todos os sete aminoácidos (ciclo-(D-alanine<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-glutamate<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>)), sendo mais frequente a substituição de L-aminoácidos nas posições 2 (X) e 4 (Y), e desmetilação de aminoácidos nas posições 3 e/ou 7 (Figura 7). As microcistinas são extremamente estáveis e resistentes à hidrólise química ou oxidação próximo do pH neutro (DAWSON, 1998, SIVONEN e JONES, 1999).

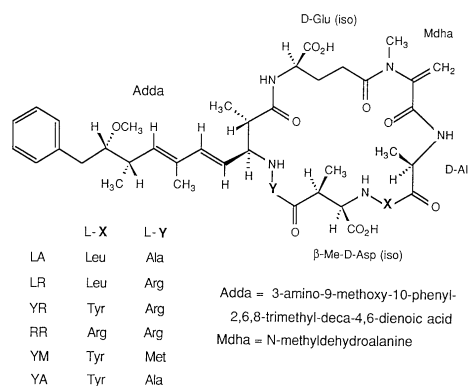


Figura 7- Estrutura química da Microcistina (MC) (Fonte: Watanabe et al., 1989).

*Microcystis* pode produzir uma variedade de toxinas, diferindo nas L-aminoácidos variáveis, ou seja, MC-LA, YA, LR, YM, RR e YR (SIVONEN et al, 1990). Todos os tipos de microcistina possuem espectro de absorção de UV característico, com um pico forte a 238 nm devido à dieno conjugado do resíduo ADDA (FALCONER, 2004).

MC-LR (lisina-arginina) (MM= 995 g/mol) é a toxina amplamente estudada, já que está frequentemente presente em floração de cianobactérias toxigências em rios e lagos (SIVONEN et al, 1990;. FIGUEIREDO et al, 2004;. IARC, 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS), estabeleceu um valor de referência provisório para MC-LR em água potável de 1 µg / L, com base em

uma dose diária tolerável (TDI) de 0,04 mg / kg de peso corporal (WHO, 2003). A MC-LR é classificada como possivelmente cancerígeno para os seres humanos (Grupo 2B) (IARC, 2010).

A toxicidade da microcistina é devido a absorção em hepatócitos, por meio de um sistema de transporte (sistema de transporte multi-específica para ácidos biliares), seguida pela inibição da serina/treonina fosfatases 1 e 2A, resultando na hiperfosforilação de proteínas. O desequilíbrio da fosforilação proteica provoca interrupção de muitos processos celulares, alteração e rearranjo do citoesqueleto, a perda de adesão célula-célula, e, conseqüentemente, desordenação da arquitetura hepática (FUJIKI et al., 1996; GOLDBERG et al., 1995; NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1990)

Morte de animais foram relatadas após o consumo de água contendo um grande número ( $> 10^6$  cél./mL) de células de cianobactérias (WHO, 2003). Em 1996, surto de doença foi relatada em uma clínica de hemodiálise em Caruaru, Pernambuco. Nesta clínica, 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda, resultando na morte de mais de 50 pacientes. A análise do sistema de tratamento de água da clínica identificaram dois grupos de cianotoxinas: MC e cilindrospermopsina, e em soro e tecido do fígado de pacientes detectaram MC (AZEVEDO et al, 2002; IARC, 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Os objetivos do trabalho visaram estudar técnicas imunológicas, como desenvolvimento de hibridoma e cultivo celular para produção de anticorpo monoclonal, com a aplicação na análise de toxinas naturais oriunda da cadeia produtiva. Além disso, o trabalho propôs implementar ic-ELISA para análise rápida de aflatoxinas (AFs), Desoxinivalenol (DON) e Zearalenona (ZEA) visando controle de qualidade das matrizes alimentares.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Conjugar microcistina-LR com proteína (BSA, OVA e KLH);
- Imunizar camundongos com o conjugado e analisar o soro imunizado;
- Proceder a fusão celular (mieloma e células esplênicas) para obter hibridoma produtor de anticorpo monoclonal anti-microcistina;
- Clonar células positivas na produção de anticorpo contra microcistina até garantir célula monoclonal;
- Estabelecer condições para imunoensaio na análise de microcistina;
- Cultivar e manter hibridoma secretor de AcM IgG específico para aflatoxina e zearalenona;
- Produzir IgG anti-AFs e anti-ZEA procedendo cultivo de hibridoma em meio sintético, seguido de concentração e purificação;
- Implementar ic-ELISA na análise de Aflatoxinas, Desoxinivalenol e Zearalenona em milho;
- Implementar ic-ELISA na análise de Zearalenona em trigo;
- Implementar ic-ELISA na análise de Desoxinivalenol e Zearalenona em biscoito tipo maria, maizena, cream cracker e água e sal.

O trabalho foi redigido sob forma de capítulos, listados abaixo:

CAPÍTULO 1: HYBRIDOMA GENERATION: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST MICROCYSTIN

CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-MICOTOXINA (AFLATOXINA E ZEARALENONA) UTILIZANDO LINHAGEM AF.2 E ZEN.2

CAPÍTULO 3: ELISA COMPETITIVO INDIRETO PARA ANÁLISE DE AFLATOXINAS, DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM DIFERENTES ALIMENTOS

## **CAPÍTULO 1: HYBRIDOMA GENERATION: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST MICROCYSTIN**

### **INTRODUCTION**

Microcystins (MC) are cyanobacterial secondary metabolites produced by filamentous genera (*Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Aphanizomenon* sp., *Cylindropermopsis* sp.), as well as coccoides of the order Chroococcales (*Microcystis* sp.) (LUUKKAINEN et al., 1993; CARMICHAEL, 1995). MC-LR (lysine-arginine) is the most extensively investigated toxic cyclic heptapeptide due to frequent occurrence in cyanobacterial blooms in rivers and lakes (SIVONEN et al., 1990; FIGUEIREDO et al., 2004; IARC, 2010). Taking into account that MC-LR is classified as possibly carcinogenic to human (Group 2B) (IARC, 2010), World Health Organization (WHO) determined a provisional guideline value for MC-LR in drinking- water of 1 µg/L, based on a tolerable daily intake (TDI) of 0.04 µg/kg bw (WHO, 2003).

The available MC-LR detection methods are based on physico-chemical methods as high performance liquid chromatography with UV or photo diode array detector, liquid chromatography–mass spectrometry and thin layer chromatography; the biological methods are based on colorimetric protein phosphatase (PP) inhibition test and immunology methods as Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Currently, more sensitive screening, rapid, low cost methods are being developed aiming to monitor MC-LR. Detection methods using antibody (poly or monoclonal) are suitable for screening, in addition to using less organic solvents. Hybridoma technique allowed the production of unlimited monoclonal antibody (mAb) that shows advantages due to unrestricted production from hybridoma and specific to single epitope (part of antigen) (KÖHLE and MILSTEIN, 1975; TIZARD, 1995; ROITT et al., 1997). Microcystins monitoring in environmental water requires sensitive and practical

rapid method. Therefore, this study aimed to prepare hybridoma cell producer of monoclonal antibody (mAb) against microcystin.

## MATERIAL AND METHODS

### 1 Material

Microcystin-LR was isolated from *Microcystis aeruginosa* TAC 95 (Tsukuba Algal Collection, Tsukuba, Japan) by Hashimoto Elisabete H., Dr. and Harada Ken-Ichi, Dr. (2006-2007). The mAb M8H5 line (Nagata et al., 1995) was obtained from Microcystin ELISA Kit (Tokiwa Chemical Industries Co., LTD). Tests were carried out in Balb/c CrSlc female mouse (Japan SCL Inc., Japan). Albumin from Chicken Egg white, grade V, min 98% (OVA); Freund's Complete Adjuvant; Freund's Incomplete Adjuvant and N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDPC) were obtained from Sigma-Aldrich Co., USA. GIT medium; HAT media supplement (50x); Hemocyanin from Keyhole Limpet (KLH); Kanamycin sulfate; L(+)-glutamine; N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC); N,N-Dimethylformamide (DMF); N-Hydroxysuccinimide (NHS) were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Japan. Bovine Serum Albumin – IgG-free, Protease-Free was obtained from Jackson Immunoresearch Laboratories, USA; BCA Protein Assay – Reagent Kit (Thermo Scientific, USA); Dulbecco's modified Eagle medium without sodium bicarbonate powder (DMEM) from Nissui Pharmaceutical Co., Japan; Polystyrene microplate 96 wells (Maxisorp, Nunc, USA); phosphatase alkaline ALP-anti-mouse IgG (Southern Biotechnology Association, UK); 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (pNPP) (Fluka- Biochemika, Switzerland); 1M HEPES solution, HT supplement (100x), Medium NCTC-109, MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X) (NEAA), from Gibco, USA.

PBS buffer was prepared by mixing 8g of NaCl, 0.2g of KCl, 1g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 14.5g of

NaHPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O in 1 L of distilled water.

Git medium: commercial Git medium (maintained at -30°) was thawed 2 days prior the cultivation of cells (3 weeks of validity under 4°C). Git medium is a selective medium for hybridoma production, that is mainly composed of growth factor (3000 mg/L) and insulin (2.0 mg/L) (KUDO et al., 1987).

DMEM medium: an amount of 4.75g of DMEM powder was added to fresh Milli-Q H<sub>2</sub>O (about 450mL), and stirred for 30 min (magnetic agitation), completed up to 500mL, and autoclaved for 20 min at 121°C. The cooled solution was added with 3-7 mL of 7.5% NaHCO<sub>3</sub> until the change of yellow to orange color. After, 5mL of Kanamycin (10 mg/mL) and 10mL of 3% L-glutamine solution was added into the medium, and mixed. This basic medium for washing the cell or preparation of other culture medium could be stored at 4°C for 2 weeks.

50% (w/v) PEG4000: it was weighted 2 g of PEG4000 in bottle. The bottle was autoclaved for 20 min at 121°C. After that, with PEG still in liquid state, 2 mL of 20mM HEPES-DMEM was added and stored at -80 °C.

HY medium: to prepare HY medium, GIT medium (500 mL) was added to NCTC 109 (27.5 mL), NEAA (5.5 mL), Kanamycin solution 10 mg/mL (5.5 mL) and 3% L-Glutamine (10 mL).

HAT medium: HAT media supplement (50x, lyophilized powder) was dissolved in 10 mL of sterile H<sub>2</sub>O or DMEM, stored at -30°C. Then, 50 mL of HY medium was added 1 mL of HAT media (50x) and IL-6 solution (2U/mL).

HT medium: to prepare HT medium, 100 mL of HY medium was added 1 mL of HT media supplement solution (100x) and IL-6 solution (2 U/mL).

G-PBS: NaCl (4.38 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O (20,41g) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,44 g) was mixed in 1 liter of fresh Milli-Q H<sub>2</sub>O. It was autoclaved for 20 min at 121°C and stored at room temperature.

Lysis Buffer: 0.16M NH<sub>4</sub>Cl (8.3g/L) and 0.17M Tris pH 7.65 (20.3g/l) (2-amino-2-hydroxymethyl 1,3-propanediol) were mixed in 9:1 ratio and adjust pH to 7.2. After the solution was sterile-filter (0.22µm) and stored at 4 °C for 1 week.

## **2 Preparation of microcystins-protein conjugates**

### **2.1 MC-LR-BSA, -OVA and –KLH via carbodiimide using EDPC**

An amount of 20 mg of BSA in 0.1 M NaCl (2 mL) was mixed with MC-LR (2 mg) and dissolved in a solution of 48 µl of MeOH, 3 mL of phosphate buffer (pH 7.0) and 10 mg of EDPC. The final solution was stirred overnight in dark place at room temperature. MC-LR-OVA, MC-LR-KLH were prepared in a similar procedure previously described above and their negative control (EDPC-BSA, -OVA and –KLH) without MC-LR (NAGATA et al., 1995).

### **2.2 MC-LR-BSA, -OVA and –KLH via NHS-ester (DCC/NHS)**

An amount of 20 µl of a solution of 34 mg NHS in 1.0 mL of dry DMF and 26 µl of a solution of 38 mg DCC in 1.0 mL of dry DMF were added to a solution of about 2.5 mg MC-LR in 0.4 mL of dry DMF and homogenized overnight at room temperature. This solution (400 µl) was added to an ice-cold solution of 5 mg protein (BSA, OVA and KLH) in 1150 µl of coupling buffer and shaken for 6 h, while warming up to room temperature (addition of the NHS-ester solution in dioxane raises the buffer's pH to 8.5–9.0) (CERVINO et al., 2008). The negative controls (DCC/NHS-BSA, OVA and KLH) were prepared as described above. The conjugate was dialyzed against PBS (8x1L). The concentration of protein was measured by BCA assay.

### **2.3 Protein determination – BCA assay**

Protein concentration of these conjugates was estimated by BCA assay in two replicates, compared with BSA or KLH (2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.25 µg/mL in PBS) as standards.

The conjugates were diluted in PBS (1/2; 1/4; 1/8).

Standard or sample (0.1 mL) was mixed with 2.0mL of WR (Working Reagent: 50 parts of Reagent A + 1 parte of Reagent B), covered and incubated at 37°C for 30 minutes. Then 0.15 mL of was pipetted in the 96-microplate (triplicate) and the absorbance measured at 540 and 590 nm. The standard curve was prepared by plotting the 540 and 590 nm measurements for each BSA or KLH standard minus average Blank vs. its concentration in  $\mu\text{g/mL}$ . The sample concentration was determined using standard curve.

#### **2.4 Checking the coupling of conjugate (MC-LR-KLH; MC-LR-BSA and MC-LR-OVA) by i-ELISA**

Conjugates were checked to confirm the coupling toxin-protein. The immunoassay was performed using AcM M8H5 line (Nagata et al., 1995; Microcystin ELISA Kit – Tokiwa Chemical Industries Co., LTD). The concentration test was 1.25; 2.5; 5; 10; 25  $\mu\text{g/mL}$  of conjugates (MC-LR-protein) and used as negative control, EDPC-protein (5  $\mu\text{g/mL}$ )

### **3 Immunization of mice**

#### **3.1 MC-LR-KLH**

Ten female BALB/c mice (7-8 weeks) were divided in 2 groups (Group A was injected 25 or 100  $\mu\text{g}$  of MC-LR-KLH or 25  $\mu\text{g}$  of MC-LR-BSA and Group B was injected 10 or 50  $\mu\text{g}$  of MC-LR-KLH or 10  $\mu\text{g}$  MC-LR-BSA). The emulsion was prepared adding 1 mL of MC-LR-KLH (1mg/mL) to 1 mL of Freund's Complete Adjuvant (for the first immunization) and Freund's Incomplete Adjuvant (for the boosts). In boost 4, MC-LR-BSA was injected instead of MC-LR-KHL, to test whether serum O.D. (optical density) could increase. In addition, in the boost 5, returned to MC-LR-KHL at concentration of 100 and 50  $\mu\text{g}$  (group A and B, repectively). MC-LR-KHL was used

because MC-LR-BSA was not sufficient to realize next experiments.

Immunization Scheme:

1 <sup>st</sup> Experiment	Amount of conjugate	Day
1 <sup>st</sup> immunization (MC-LR-KLH+FCA, s.c.)	25 µg – group A 10 µg – group B	0
Boost 1 (MC-LR-KLH+FIA, s.c.)	25 µg – group A 10 µg – group B	14
Bleed		21
Boost 2 (MC-LR-KLH+FIA, s.c.)	25 µg – group A 10 µg – group B	28
Bleed		35
Boost 3 (MC-LR-KLH+FIA, i.p.)	25 µg – group A 10 µg – group B	54
Bleed		61
Boost 4 (MC-LR-BSA+FIA, i.p.)	25 µg – group A 10 µg – group B	83
Bleed		90
Boost 5 (MC-LR-KLH+FIA, i.p.)	100 µg – group A 50 µg – group B	97
Bleed		114
Boost 6 (MC-LR-KLH+FIA, i.p.)	100 µg – group A 50 µg – group B	121
Bleed		128

### 3.2 MC-LR-BSA

Ten female BALB/c mice (7-8 weeks) were divided in 2 groups (Group A was injected with 25 µg of MC-LR-BSA and Group B was injected with 10 µg of MC-LR-BSA).

An emulsion was prepared consisting of 0.5 mL of MC-LR-BSA (2mg/mL) with 1 mL of Freund's Complete Adjuvant (for the first immunization) and Freund's Incomplete Adjuvant (for the boosts). In Boost 2, the concentration of MC-LR-BSA was increased to 200 and 100 µg for groups A and B, respectively.

Schema of immunization:

2 <sup>nd</sup> Experiment	Amount of conjugate	Day
1 <sup>st</sup> immunization (MC-LR-BSA+FCA, s.c.)	25 µg – group A 10 µg – group B	0
Boost 1 (MC-LR-BSA+FIA, s.c.)	25 µg – group A 10 µg – group B	14
Bleed		21
Boost 2 (MC-LR-BSA+FIA, i.p.)	200 µg – group A 100 µg – group B	28
Bleed		35
Boost 3 (MC-LR-BSA+FIA, i.p.)	200 µg – group A 100 µg – group B	42
Bleed		49

### 3.3 I-ELISA

Polystyrene microplates (96 wells) were coated with 50  $\mu$ l of MC-LR-OVA or EDPC-OVA / MC-LR-BSA or EDPC-BSA (5  $\mu$ g/mL) in PBS and incubated overnight at 4° C. After washing (three times) with PBS+0.05% Tween (PBS/Tween), the wells were blocked with 75  $\mu$ l 0.1% ovoalbumin (OVA) in PBS and incubated for 1 h at room temperature. After washing (three times) with 0.05% PBS/Tween, 50 $\mu$ l serum diluted (1/20 to 1/200000) in PBS were added. After 1 h incubation at room temperature, the microplate was washed three times with PBS/Tween, added to 100  $\mu$ l ALP-anti-mouse IgG (1:2000 in PBS/Tween) and incubated for 1 h at room temperature. After washing (three times, twice) with PBS/Tween, 100  $\mu$ l pNPP (1mg/mL) in 0.1 M Diethanolamine Buffer with 0.50 mM Magnesium Chloride, pH 9.8 were added and plates were incubated for 45 min at room temperature. The absorbance was determined at 405 nm.

## 4 Hybridoma cell - Monoclonal antibody

### 4.1 Cell fusion protocol

#### 4.1.1 Preparation of myeloma cell (SP2/0-Ag14)

The stored SP2/0 cell in liquid N<sub>2</sub> was submitted to fast thawing at 37 °C, 6 days prior to the cell fusion. Myeloma cell was cultivated in GIT medium to reach 0.2~1.2 x 10<sup>6</sup> cell/mL (log growth phase), and approximately 2x10<sup>7</sup> cells in log phase was submitted to cell fusion.

The protocol of cell fusion was adapted from that described by Oi and Herzenburg (1980). Three days before cell fusion, 25-50 $\mu$ l of 100 $\mu$ g/mL of conjugate in sterile PBS was injected in Balb/C mouse by retro-orbital (intravenous, the final boost). The mouse was killed by cutting carotid artery, and the blood immediately collected in Falcon tube. This positive control serum (kept overnight at 4 °C and centrifuged at 200x g /10 min) was stored in 0.1% NaN<sub>3</sub>.

The killed mouse was then disinfected with 70% ethanol (all holes), and put in a Petri dish (Clean bench). After incision, the peritoneum membrane was cut with sterile scissor, and the disinfected abdomen was opened and the spleen (roughly triangular elongated organ in the left cranial abdomen) was removed with two thin tweezers, and it was transferred into Petri dish, and mixed with 10 mL of DMEM. The spleen was stucked with 18G needle, and 10 mL of 15% FBS-DMEM injected while massaging the spleen with tweezer or forceps for exsudation of cells, until turn transparent/white color.

The tissue exsudate was transferred in 50 mL centrifuge tube adapted with stainless steel mesh. The plate was washed with 15%FBS-DMEM by pipetting 2 times, and transferred in same tube with stainless steel mesh. After centrifugation (200 x g /6min), the supernatant was aspirated, and the bottom of tube was flicked gently to break the pellet (cells). The cells were suspended in G-PBS (45 mL), or Lysis Buffer (COLD LYSIS BUFFER -10-15mL, incubated for 3-5 min, and 30 mL of DMEM was added), and centrifuged (200 x g /6 min). This step was repeated until the cell mass became white/almost white (changed the tube each step). The spleen cells were suspended in DMEM (10mL), then 50  $\mu$ l transferred in an Eppendorf tube with 50  $\mu$ l of 0.25% Trypan blue in PBS, and counted in eosinophil counter.

The spleen cell solution and myeloma cell solution was mixed in the ratio of spleen cell: myeloma cell (10~3:1,  $2 \times 10^8$  :  $2 \times 10^7$  cell). After centrifugation (200x g /6min), all medium was aspirated and the cell pellet was gently destroyed. After, 1 mL of warm 50% PEG4000 was added slowly (drop by drop) and shaken by hand for 1 minute., and then it was shaken again for 1 min. In 2 minutes, 2 mL of warmed 20mM HEPES-DMEM was added, then 7 mL of warmed 20mM HEPES-DMEM was added in 3 min. Finally, 2 mL of warmed FBS was added slowly, drop by drop and the tube was agitated. The pellet of cells formed by centrifugation (100 xg/5 min ) and medium

was aspirated and was added warmed HAT medium and 0.1 mL in 96 well-plate was pipped (in each well had  $2.5 \times 10^6$  cell/mL of spleen cells).

After, 1 day after cell fusion, 0.2 mL of warmed HAT medium was added. The medium was changed every 2 days until cell colony was found by looking at the bottom of plate and the color of medium changed to yellow (day 7 -10 after fusion). Then, activity against MC-LR was checked for activity against MC-LR by i-ELISA.

Positive wells were moved to 24 well-plate and added 0.4 - 0.5 mL of HT medium for one day culture and re-checked by i-ELISA and ic-ELISA.

#### **4.2 Cell cloning**

Positive wells were cloned by limiting dilution method. Prior, cells were suspended, counted and transferred to a tube 1, resulting in 1600 cells/mL in DMEM. In the Falcon tube, 0.1 mL of tube 1 was mixed with 3.1 mL of HT medium with IL-6 (in the second cloning, HY medium with IL-6 was used). This solution (50 cell/mL) was pipetted (0.1 mL) into A row (A2–A11) and H row (H2-H11), and in each well probably had 5 cell (5 cell/well). The rest of volume (1.2 mL) was added to 4.8 mL of HT or HAT or HY medium (the medium used depend of step of cell cloning) and pippeted 0.1 mL in 60 wells (1 cell/well). After 4-5 days of cloning, 0.2 mL of warmed medium was added in each well. Approximately 7-8 day after cloning, 150  $\mu$ L of supernatant was removed and checked the activity by ELISA.

Positive wells, cells were suspended, moved to 24 well-plate and added 0.4 - 0.5 mL of medium (4 or 5 drops) for 1-2 day culture. After, the activity was rechecked by ELISA and ic-ELISA. The well where the activity and proliferation cell were confirmed was re-cloned. Also, after growth (4 wells of 24 well-plate), the clone was frozen (keep  $-80$  °C). The clone cell was re-cloned until obtaining a growth of a single and stable clone.

### 4.3 Freeze cell

The freezing procedure was carried out in positive well (growth and activity against MC-LR). The cells were expanded in log phase of growth. The cells were suspended, transferred to a 15 mL Falcon tube and counted (Viable cells > 90% (~ 10<sup>6</sup> cell)). After centrifuged (200x g / 6 min), the supernatant was aspirated and the pellet was suspended in 0.5 mL of cold FBS:DMSO (1-5 x 10<sup>6</sup> cell) and pipetted into a cryotube. After, it was stored at -80 °C for one day and transferred to liquid N<sub>2</sub>.

### 4.4 Ic-ELISA

The ic-ELISA was coated with 100 µl of MC-LR-KLH(DCC/NHS) in PBS (5 µg/mL) or directed MC-LR in 0.1M Carbonate-bicarbonate buffer at pH 9.6 (1µg/mL). Inhibition step was performed by adding 50 µl of MC-LR (1µg/mL) and after 50 µl of supernatant (pure or diluted). The second antibody and signal development were performed as describe in i-ELISA.

## 5 Optimization of ELISA

Optimal conditions were established for ELISA as coating step, blocking step, competition step and second antibody step. The supernatant of clone 8E7-1B4-F6 cultivated in Git medium was used as antibody anti-MC-LR.

Polystyrene microplate (96 wells) was coated with 50 µl of toxin-protein conjugate and incubated overnight at 4° C. After washing (three times) with PBS+0.05% Tween (PBS/Tween), the wells were blocked with 100 µl of blocking solution and incubated for 1 h at temperature room. After washing (three times) with 0.05% PBS/Tween, 50µl supernatant diluted in PBS were added. After 1 h incubation at room temperature, the microplate was washed three times with PBS/Tween, added to 100 µl of secondary antibody (anti-mouse IgG-enzyme conjugate) and incubated for 1 h at room temperature. After washing (three times, twice) with PBS/Tween, 100 µl of substrate were added and

the absorbance was determined after 45 min at room temperature.

### **5.1 Blocking step**

For blocking step, 8 solutions using 4 different compounds (OVA; gelatin; skim milk; and PEG in PBS) were tested. A short description of how they were prepared is presented below. The test of blocking solution was performed by i-ELISA coated with PBS and performed as described above, using supernatant of clone 8E7-1B4-F6 (1/30 in PBS), ALP-anti-mouse IgG (1:2000 in PBS/Tween) and pNPP as substrate.

- 1) 0.1% OVA – dissolved in PBS, shaken slowly and sonicated for 1 min.
- 2) 0.5% gelatin – chemically pure, purchased by Wako Pure Chemical Industries; Osaka, Japan. The gelatin was prepared with 1% (w/v) in PBS, autoclaved at 121 °C for 20 min. For use use, it was diluted to 0.5% in PBS.
- 3) 0.5% gelatin - The gelatin in PBS was heated at 60-70 °C for 15 min.
- 4) 0.5% gelatin –purchased in a local market. The gelatin in PBS was heated at 60-70 °C for 5 min.
- 5) 0.1% skim milk - purchased in a local market (36.3 g of protein in 100 g), was dissolved in PBS, shaken slowly and sonicated for 1 min.
- 6) 0.5% skim milk - purchased in a local market,was dissolved in PBS, shaken slowly and sonicated for 1 min.
- 7) 0.1% PEG - dissolved in PBS, shaken slowly and sonicated for 1 min.
- 8) 0.5% PEG dissolved in PBS, shaken slowly and sonicated for 1 min.

The results were compared with wells that were not exposed to blocking step.

### **5.2 Coating step – Toxin-protein conjugate**

The test of coating solution was performed using PBS, and 0.1 and 0.01M Carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6. The concentration of conjugate tested was 1, 0.5, 0.2, 0.1 and 0.05 µg/mL. The antibody was diluted in PBS, PBS/Tween or blocking solutions, and the next steps of immunoassay was fixed as in i-ELISA.

### **5.3 Second antibody step**

ALP-anti-mouse IgG (1:2000 in PBS/Tween) / pNPP and HPR-Anti-mouse IgG (1:10000 in

PBS/Tween) / TMBZ were tested as system of signal development. When TMBZ was used as substrate, the reaction was stopped by 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and read at 450 nm.

## RESULTS AND DISCUSSION

The Figure 8 showed the entire scheme of hybridoma generation for producing monoclonal antibody against MC-LR.

### 1 Preparation of microcystins-protein conjugates

The toxin-protein conjugates were prepared according by the methodologies (item 3.1 and 3.2) and were measured protein concentration by bicinchoninic acid (BCA) assay (Table 1). The bicinchoninic acid assay is similar to Lowry procedure in which there is formation of a Cu<sup>2+</sup>-protein complex under alkaline conditions, followed by reduction of the Cu<sup>2+</sup> to Cu<sup>1+</sup>. The amount of reduction is proportional to the protein present (cysteine, cystine, tryptophan, tyrosine, and the peptide bond) (SMITH et al, 1985).

The achievement of conjugation coupling was checked using AcM anti-microcystin M8H5 line (1:6000 in Assay buffer). The results showed that the prepared conjugate MC-LR-KLH, -BSA and -OVA had capacity of link with antibodies and EDPC- or DCC/NHS-protein did not react with antibodies (Figure 9). The O.D. (405 nm) increased according to the increase of the concentration conjugate for MC-LR-KLH and MC-LR-OVA. The different of coating concentrations of MC-LR-BSA tested did not change the O.D., probably, because this antibody was generated by MC-LR-BSA immunization.

When the conjugates were prepared, the objective was using MC-LR-KLH (EDPC) as immunogen and MC-LR-BSA (EDPC) as coating in i-ELISA. However, due to negative response by immunized mice during the experiments, in which sera of mice reacted either with MC-LR-protein

(BSA or OVA) and EDPC-protein (BSA or OVA) (negative control) (results were discuss in section 3. Immunization of mice), new toxin-protein conjugates (via NHS-ester (DCC/NHS)) were prepared to be used in screening assay.

## **2 Immunization of mice**

The immunization of mouse with conjugate (MC-LR-KLH) was selected according to LD50 ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (SIVONEN and JONES, 1990). Two experiments of mice immunization were performed. In the first immunization with MC-LR-KLH, after 1 week of each boost, the sera were analyzed by i-ELISA using MC-LR-protein conjugate and the negative control (EDPC-protein). The results of immunized mice were showed in Figure 10.

For the experiment using mice immunized with MC-LR-KLH (Figure 10), sera analyze by i-ELISA of the bleed 1 and 2 used MC-LR-BSA as coating solution, bleed 3 used MC-LR-BSA and MC-LR-OVA and for 4, 5 and 6 used MC-LR-OVA due to boost 4 was made using MC-LR-BSA. The mice until boost 3 did not show a high immune response by ELISA, therefore in boost 4, the conjugate was changed to MC-LR-BSA expecting to increase the response. This test did not improve the immune response, thus MC-LCR-KLH was used again as conjugate and the amount increased to 100 and 50  $\mu\text{g}$  for group A and B, respectively, injecting more twice (boost 5 and 6).

Usually, immunized animal had higher responde against the conjugate (toxin) with 3 or 4 injections of conjugate. Sheng, et al. 2007 obtained a high response against MC using 4 injections of MCLR-BSA in BALB/c mouse; Pyo, et al., 2003 and 2005 used MCLR-KLH (EDAC) 4-5 immunization; and Baier, et al., 2000 injected MCLR-PLL 4 times. However, sometimes, the animal needs more injections of conjugate to produce a high response against toxin. Zeck, et al. 2001a injected MCLR-cOVA 5 times in NMRI and BNR female mice. Zeck, et al., 2001b injected the

conjugate 6 times, also using two conjugate (N-ac-Adda-KLH and N-ac-Adda-BSA) in Balb/cx57 to obtain a immune response against toxin.

In the second experiment, mice were immunized with MC-LR-BSA. The reason was that Nagata et al., (1995), obtained the specific hybridoma (M8H5 line) immunization with MCLR-BSA. The mice immunized with MC-LR-BSA experiment (Figure 11) showed that some of ELISA results of the bleed 3 obtain O.D. less than the D.O. of bleed 2. Possibly, the boost 3 was not sufficient to induce the immuno response.

ELISA plots of every serum tested showed hyperbolic curve shape, i.e., probably the antibodies produced showed low concentration of high affinity antibodies. In addition, the results of experiment showed that all sera of mice reacted with MC-LR-OVA and EDPC-OVA (negative control). Even increasing the amount of toxin injected, there was no difference between O.D. (405 nm) of protein-toxin conjugate and negative control. Therefore, it can indicate that the mice are also producing antibody against EDPC part in the protein and ELISA assay cannot distinguish between anti-MC-LR and anti-EDPC antibody, since the coating solution (MC-LR-OVA and EDPC-OVA) was made with same protocol.

The EDPC (water-soluble carbodiimide) was used to mediate the formation of amide linkages between carboxyl (toxin) and amines (protein) groups. This reaction also can result in an undesired molecule, the N-acylurea, due to rearrangement of the O-acylisourea (Figure 12) (JOULLIÉ and LASSEN, 2010).

A protein molecule has also carboxyl groups that can form amide linkage between proteins to proteins. Furthermore, the carboxyl group of protein can react with EDPC and result in N-acylurea molecule. These molecules can be recognized by the immune system of mouse and produce antibody against them.

Carrier proteins (KLH, BSA and OVA) for immunization and coating conjugate of ELISA were selected by the number of lysine residues of molecule. The protocol of conjugation regarded that KLH contains 2000 amines from lysine residues, using an average multi-subunit MW of 5000 kDa), BSA has 30-35 lysines available and OVA has 19 lysines as amine group and carboxyl group of MC-LR (HERMANSON, 2008).

In theory, when the conjugation was prepared, equimolar ratio was 1:26:0.002 to MC-LR:EDPC:KLH; 1:26:0.15 to MC-LR:EDPC:BSA and 1:26:0.23 to MC-LR:EDPC:OVA. Therefore, possibly few MC-LR molecules were added, moreover, MC-LR has 2 carboxyl groups (D-Glu and D-MeAsp) that would be couple to protein by carbodiimide, but only 1 carboxyl group should to be linked to protein. Thus, this situation contributed to generate another types of antibodies. In addition, sometimes the conjugate for (i-ELISA) serum screening, a different spacer of toxin-protein conjugate should be used to produce a different linkage condition between toxin and protein.

Therefore, tested two conjugations were tested using CMC (*N*-Cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate)) and DCC (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide) plus NHS (*N*-Hydroxysuccinimide) as spacer. CMC also is a water-soluble reagent and DCC is water-insoluble. Instead of using MC-LR, it was used AFB2-CMO (aflatoxin B2-carboxymethyloxime) as toxin to follow the coupling by UV/VISIBLE spectra (200-500 nm). The aflatoxin coupling using DCC plus NHS was confirmed by intensive absorption at around 360 nm. However, the spectra showed that AFB2-CMO was not coupling in the AFB2-CMO-BSA (CMC) conjugation.

Therefore, another toxin-protein conjugate using DCC (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide) and NHS (*N*-Hydroxysuccinimide) as spacer was prepared,. I-ELISA of 3<sup>rd</sup> bleed of immunized mice

was prepared again, using this conjugate as coating solution.

The addition of NHS molecule controls the racemization reaction. This molecule reacts with *O*-acylisourea, being an acylating agent of lower potency, which reacts with amines but is more discriminating and does not undergo racemization (HERMANSON, 2008).

The results showed higher difference between toxin-protein conjugate and negative control when compared with previous results. Therefore, coupling toxin-protein carrier conjugation using carbodiimide insoluble-water (DCC) plus NHS were used as coating solution for i-ELISA.

### **3 Hybridoma cell - Monoclonal antibody**

In the first experiment, mouse 9 was used as tentative of cell fusion procedure because this mouse showed one of high immune response against MC-LR.

The cell fusion resulted in 53 wells (1 plate). After 7 days, the plate was analyzed by cell growth and i-ELISA. B6, C6, C8, C10 and D6 were transferred to 24-well plate, and i-ELISA and ic-ELISA was performed again the following day (Figure 13). The results showed that probably the C6 presented some activity against MC-LR. This well was cloned in 5 plates. However, the clones did not show absorbance (405 nm) higher than 0.2. Also, Figure 14 showed inhibition test (ic-ELISA) in serum of mouse (1/100, 1/10<sup>3</sup>-fold diluted in PBS) and did not present inhibition against MC-LR in 2 concentrations (100 and 1000 ng/mL).

Considering that serum and wells did not show inhibition against MC-LR, it was studied what substance could interfere in the assays. One clone-plate was tested using MC-LR-OVA (DCC/NHS); OVA-EDPC; 0.1% OVA; 0.1% BSA and 0.1% KLH as coating solution in i-ELISA. The results showed that agent blocking (0.1 % OVA in PBS) presented a considerable interference in the assay. Therefore, the coating solution was changed to MC-LR-KLH (DCC/NHS), since 0.1% KLH

did not show interference.

Also, it was changed the blocking agent to 0.5 % gelatin in PBS that showed less non-specific binding in plate, when compared with 0.1% OVA and 3% Skim milk (Table 2).

In the 1<sup>st</sup> attempt of cell fusion G-PBS solution was used to eliminate red cells. However, this procedure was time consuming (G-PBS was used 7 times) and the amount of spleen cells ( $1.34 \times 10^7$  cells, 100% viability) was low, resulting in 1 cell culture plate (53 wells). Usually, appropriated amount of spleen cells to fusion is about  $10^8$  cells. Therefore, lysis buffer was tested to eliminate red cells in mouse that did not receive final boost. Since the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  is lethal also to white cells, this solution was used 2 times. The average viability of spleen cell was 84.6% with an amount of  $2.9 \times 10^7$  cells. Even though, the viability is lower than 1<sup>st</sup> attempt, it was considered that the amount of cell was twice as high and this mouse was not stimulated by immunogen. Thus, lysis buffer was used in the 2<sup>nd</sup> attempt of cell fusion.

In the 2<sup>nd</sup> attempt of fusion, Mouse 1 and 2 were used for the cell fusion procedure . The fusion resulted in 579 wells (8 plate). After 7 days, the plate was analyzed. Thirty-eight (38) wells showed high absorbance than absorbance of serum (1:1000) and were transferred to 24-well plate and re-checked by i-ELISA using MC-LR and MC-LR-KLH coating solution (Figure 14).

The results of ic-ELISA using MC-LR and MC-LR-KHL were similar. Thus MC-LR-KLH was used as coating solution for next ELISA in order to save toxin. Wells that presented Inhibition more than 20% were cloned: 5B11, 6G9, 7C9, 8B3, 1A4, 2B9, 3C8, 3H3, 6D4 (2 plates), 8E7 (2 plates), 8C8, 3B2 (2 plates) and 1C8 (4 plates).

The clone plates (19 plates) after 7 or 9 days of cultivation were analysed by i-ELISA. It was selected 2 or 3 clones that showed the highest absorbance of positives wells of each plate, and were transferred to 24-well plate (39 clones) and rechecked by i-ELISA (data not presented) and ic-ELISA

(Figure 15a, b and c). Clone 3C8 presented cell growth but the absorbance was very low, and 7C9 did not present cells in the plate. Wells that presented Inhibition more than 50% were recloned: 1C8-2D6, 1C8-3C7, 1C8-3E8, 2B9-C5, 5B11-C4, 6G9-B10, 8B3-D6, 8E3-1B4, 8E7-1E6, 1C8-1D2, 1C8-1D6, 3H3-E7, 8E7-1D5 and 6D4-2A5

After 7 or 9 days of cultivation, the 2<sup>nd</sup> clone plates (14 plates) were analysed by i-ELISA. It was selected 1 or 2 clones that showed the highest absorbance of positives wells for each plate, and were transferred to 24-well plate (21 clones) and rechecked by ic-ELISA (Figure 15d and e). The clone 1C8-1D6 showed cell growth but the absorbance was low, so the cloning procedure was interrupted.

Fifteen clones showed inhibition higher than 50% (1C8-3C7-D5, 1C8-1D2-F2, 1C8-1D6-F7, 1C8-1D6-G5, 1C8-3E8-C8, 2B9-C5-G4, 3H3-E7-B10, 5B11-C4-C8, 5B11-C4-F5, 6G9-B10-D8, 8E7-1B4-F6, 8E7-1B4-G6, 8E7-1D5-C6, 8E7-1D5-E5 and 8E7-1E6-F8). Although 2B9-C5-G4 showed inhibition of 57%, this clone exhibited low absorbance, then it was interrupted. In addition clones 1C8-1D6-F7 and 8E7-1B4-G6 were excluded from the analysis, because showed similar clones, 1C8-1D6-G5 and 8E7-1B4-F6, respectively, and probably they are the same clones.

Stable clones, i.e. positive activity against microcystin in all growth well in the plate of clone were expanded and changed gradually to GIT medium and the growth and activity anti-microcystin by ic-ELISA were analyzed, that were compared with cell growth in HT or HY medium (Table 3).

According to results, all the clones were able to grow in GIT medium, and only clone 8E7-B4-F6 showed inhibition less than 50% in GIT medium. Then, it was selected clones of different denomination, i.e. produced in different plate in the fusion to expand and to be frozen at -180°C (10 tubes). The clones selected were 1C8-3E8-C8, 3H3-E7-B10, 5B11-C4-C8, 6G9-B10-D8, 8E7-1B4-F6, 8E7-1D5-C6, and 8E7-1D5-E5.

Four clones (1C8-1D2-F2, 1C8-1D6-G5, 3H3-E7-B10 and 8E7-1E6-F8) were cloned again, because previous plates still showed growth in some wells but without positive absorbance. The clone plates (4 plates) after 7 or 9 days of cultivation were analyzed by i-ELISA. It was selected 1 clone that showed the highest absorbance of positives wells of each plate, and were transferred to 24-well plate (21 clones) and rechecked by ic-ELISA (Figure 15f).

After the re-cloning step, it was selected clones that showed inhibition more than 50% (1C8-1D2-F2-C8, 1C8-1D6-G5-F5, 3H3-E7-B10-D4, and 8E7-1E6-F8-B5). These clones were expanded and change the medium to GIT and analyzed by ic-ELISA, compared with cell growth in HY medium (Table 4).

According to results, all the clones were able to grow in GIT medium and showed inhibition more than 50% in GIT medium. Then, it was expanded and frozen at  $-180^{\circ}\text{C}$  (10 tubes). After few days at  $-180^{\circ}\text{C}$ , the clones was thawed, cultivated in GIT medium and the growth was evaluated (Table 5). All the clones were able to grow in GIT medium after frozen at  $-180^{\circ}\text{C}$ . However 5B11-C4-C8, 8E7-1B4-F6 and 8E7-1E6-F8-B5 showed slow growth, demonstrating viability higher than 80% after only 9 days. 1C8-1D2-F2-C8 and 1C8-1D6-G6-F5 after 10 days still showed low cell viability, 57 and 47 %, respectively.

#### **4 Optimization of ic-ELISA**

The test of blocking solution showed that 0.1 and 0.5% Skim milk inhibited 99% of wells, follow by 0.1% OVA (Figure 16). 0.1% skim milk in PBS was selected to continue the optimization of ELISA. The immunoassay performed using concentration of conjugate (1, 0.5, 0.2, 0.1 and 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and coating solution (0.015M PBS and 0.1 or 0.01 M Carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6) showed that  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  in 0.1M Carbonate-bicarbonate buffer,  $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$  of MC-LR-KLH in 0.01 M

Carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 or 0.5 µg/mL in PBS exhibited considerable absorbance. In all cases the antibody solution suitable for these systems were PBS/Tween (Figure 17).

The appropriate concentration of MC-LR-KLH conjugate was 1µg/mL in 0.1M Carbonate/bicarbonate pH9.6 buffer and PBS/Tween as antibody diluent. ALP-anti-mouse IgG (1:2000 in PBS/Tween) was selected to be used as second antibody. The findings showed that using alkaline phosphatase, resulted in higher absorbances than second antibody conjugate with horseradish peroxidase (Table 6).

The experiments are being continuing at Kawamura's laboratory. A new lot of purified MC-LR kindly provided by Harada Dr., Meijo University, was used to produce a new immunogen. Currently, they had success in cell fusion and obtained 2 clone that produces high specific mAb against MC-LR.

## **CONCLUSION**

In this work, MC-LR was conjugated with BSA, OVA and KLH; and MC-LR-BSA or MC-LR-KLH were injected in BALB/c mice, being selected animal that showed high immune response to cell fusion. Monoclonal antibodies against MC-LR (9 clones) were produced after 2 attempts of cell fusion, however not showed high affinity against MC-LR. Therefore, those hybridomas were not suitable to be used as biotool to analyze MC-LR. Steps of i-ELISA were established: MC-LR-KLH (1µg/mL in 0.1M Carbonate/bicarbonate pH9.6 buffer); 0.1% Skim milk in PBS as blocking solution; the antibody against MC-LR and second antibody (ALP-anti-mouse IgG conjugate - diluted 2000-fold) were diluted in PBS/Tween and pNPP as substrate.

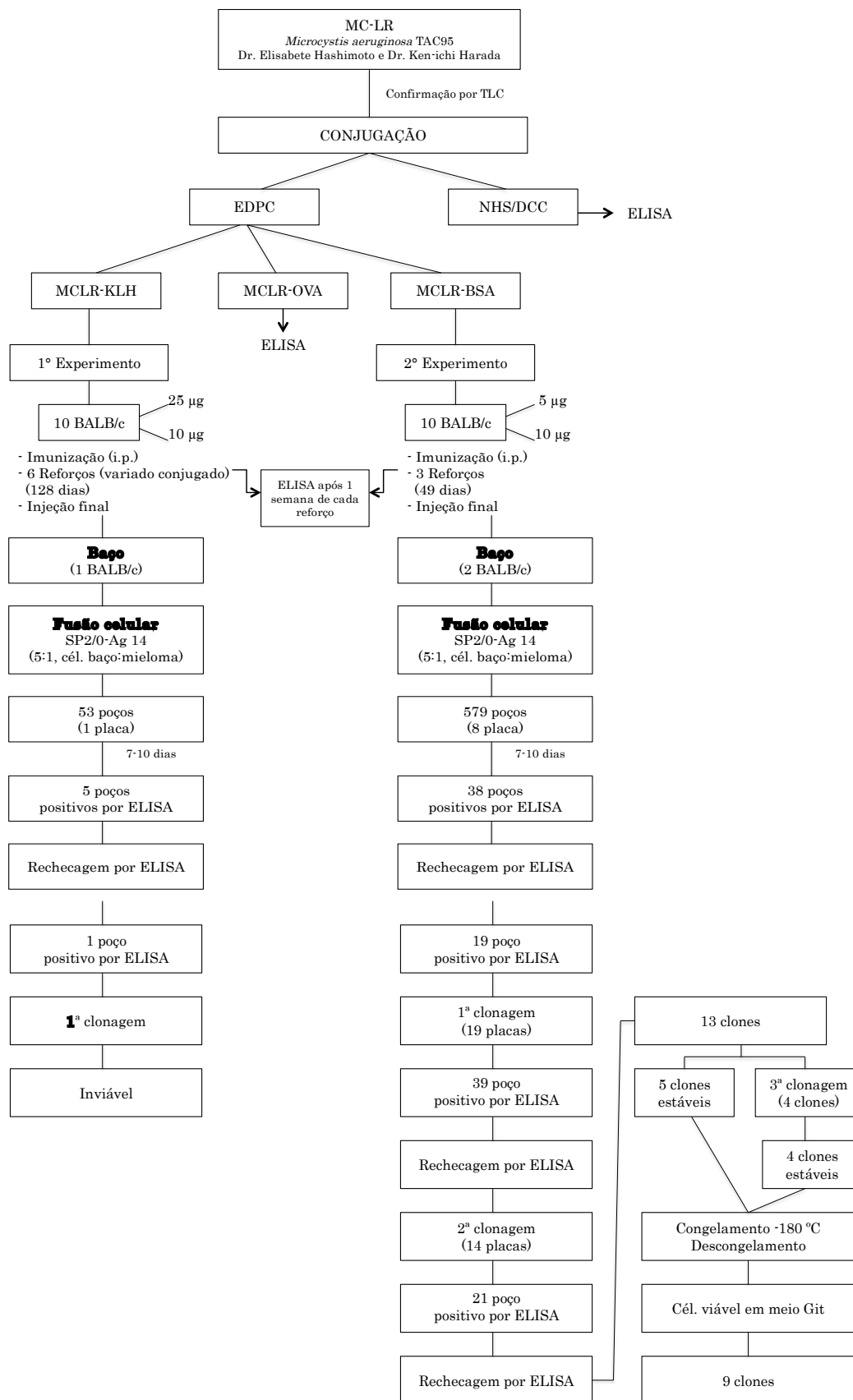
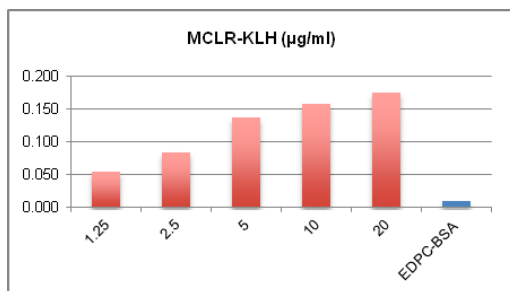


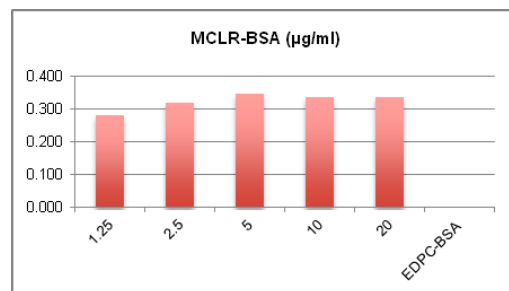
Figure 8 - Scheme development of hybridoma for producing monoclonal antibody

Table 1 – Protein concentration of MC-LR-protein (BSA, OVA and KLH) and the respective negative controls measured by BCA assay.

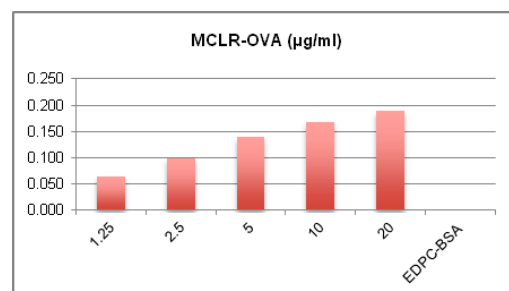
Toxin-Protein Conjugate	Protein Concentration	Volume
MC-LR-BSA (EDPC)	3.33 mg/mL	4.9 mL
Negative control (EDPC-BSA)	2.71 mg/mL	5.7 mL
MC-LR-KLH (EDPC)	1.65 mg/mL	10.4 mL
Negative control (EDPC-KLH)	1.67 mg/mL	10.5 mL
MC-LR-OVA (EDPC)	4.26 mg/mL	4.4 mL
Negative control (EDPC-OVA)	3.81 mg/mL	4.4 mL
MC-LR-BSA (DCC/NHS)	1.53 mg/mL	2.4 mL
Negative control (DCC/NHS-BSA)	1.62 mg/mL	1.6 mL
MC-LR-KLH (DCC/NHS)	1.42 mg/mL	2 mL
Negative control (DCC/NHS-KLH)	1.23 mg/mL	1.9 mL
MC-LR-OVA (DCC/NHS)	1.7 mg/mL	2.1 mL
Negative control (DCC/NHS-OVA)	1.84 mg/mL	2.1 mL



(a)



(b)



(c)

Figure 9 – i-ELISA using mAb against microcystin (M8H5 line), and MC-LR-KLH (a); MC-LR-BSA (b); MC-LR-OVA (c) and their respectively EDPC-protein (negative control) as coating solution.

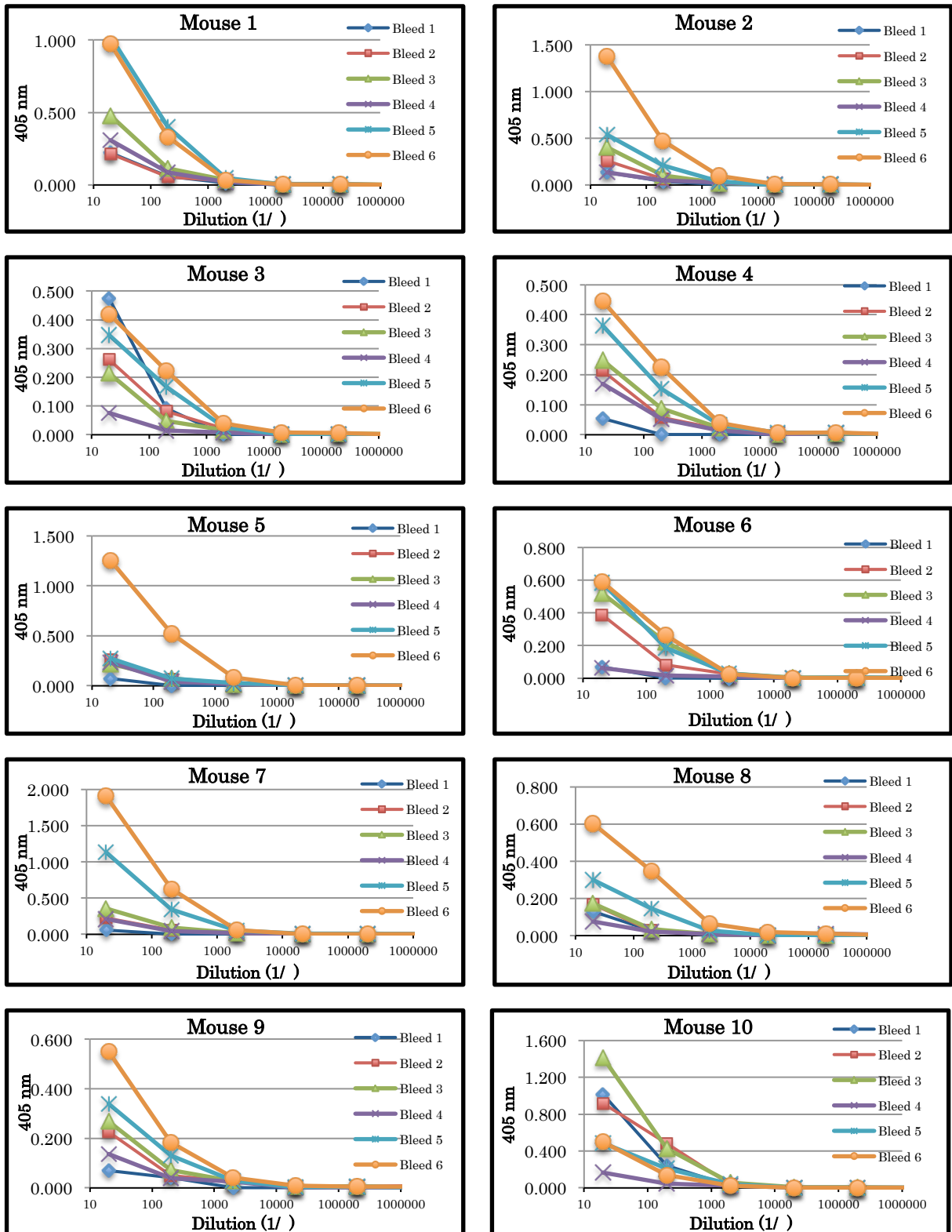


Figure 10 – First attempt of immunization. Optical density (450 nm) comparison of 6 bleeds by i-ELISA, using as coating solution MC-LR-OVA and EDPC-OVA. The bleed 1, 2 and 3 used MC-LR-BSA as coating solution and bleed 4, 5 and 6 used MC-LR-OVA.

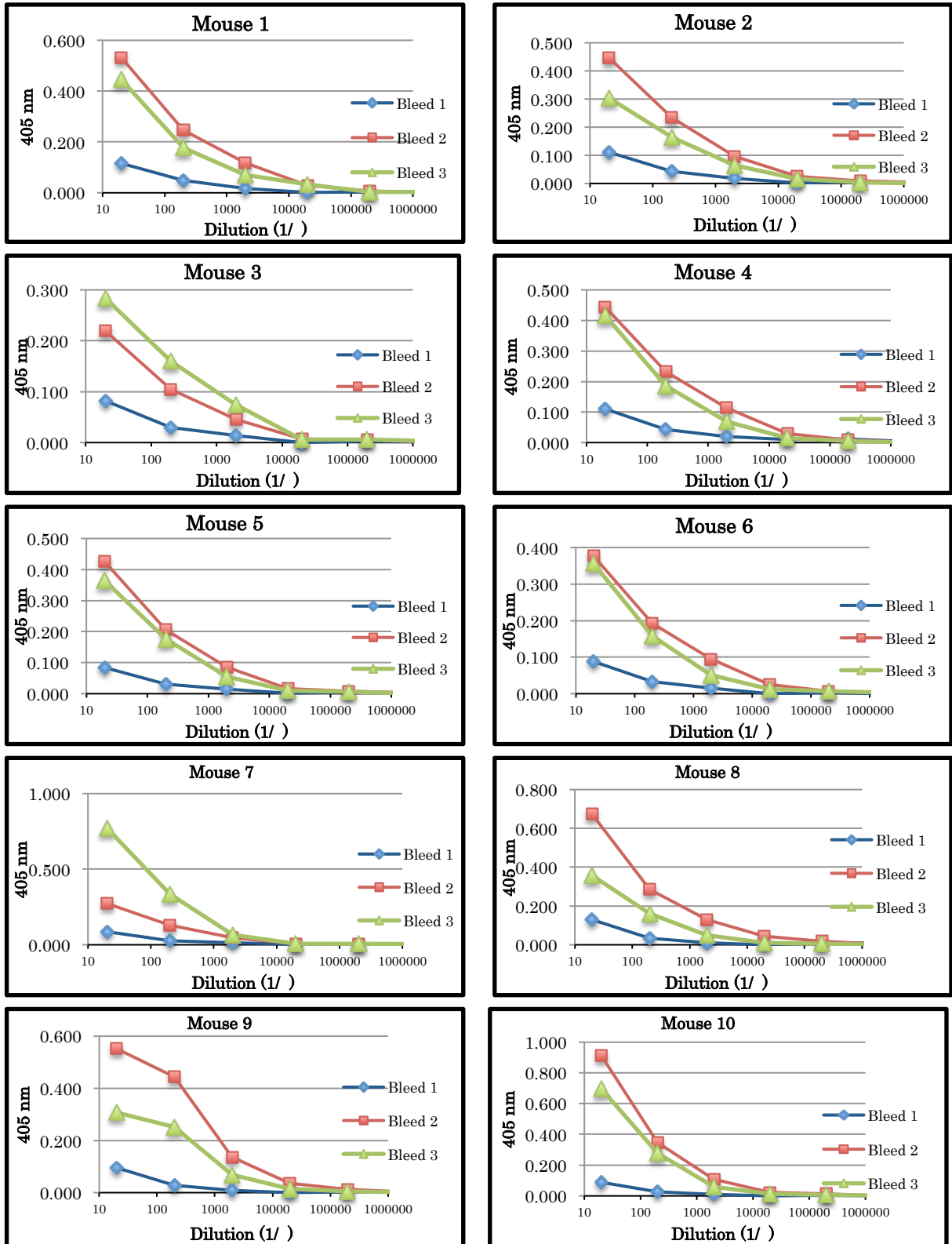


Figure 11 – Second attempt of immunization. Optical density (450 nm) comparison of 3 bleeds by i-ELISA, using as coating solution MC-LR-OVA and EDPC-OVA.

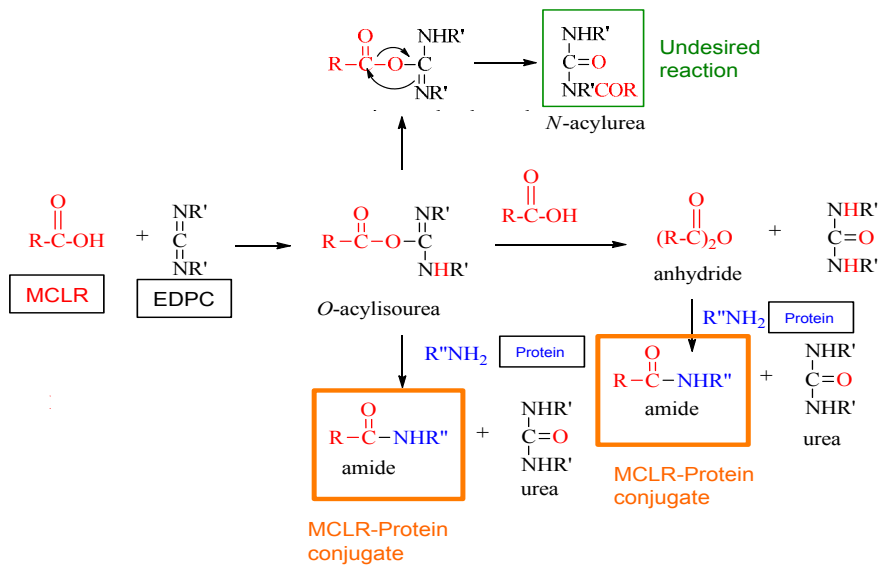


Figure 12 - Amide formation mechanism via carbodiimide. Source: Joullié and Lassen, 2010.

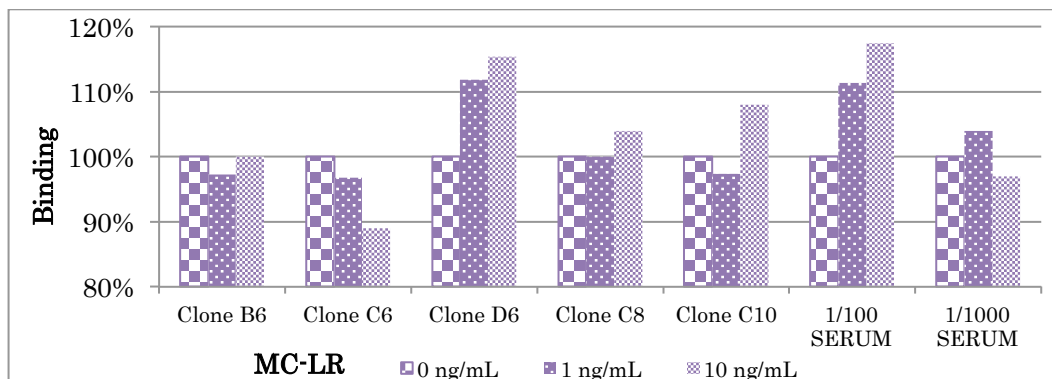


Figure 13 – ic-ELISA of positive well of cell fusion and serum mouse (positive control).

Table 2 – Evaluation of solutions (0.5% gelatin, 3% skim milk and 0.1% OVA in PBS) for reduction of the non-specific binding of the plate in ELISA.

Coating:	0.5% gelatin in PBS			Coating:	3% skim milk in PBS			Coating:	0.1% OVA in PBS		
	O.D. (405 nm)		Average		O.D. (405 nm)		Average		O.D. (405 nm)		Average
Serum 1/1000	0.04	0.039	0.040	Serum 1/1000	0.139	0.159	0.149	Serum 1/1000	0.075	0.073	0.074
Clone B6	0.007	0.006	0.007	Clone B6	0.04	0.037	0.039	Clone B6	0.097	0.099	0.098
Clone C6	0.041	0.039	0.040	Clone C6	0.268	0.339	0.304	Clone C6	0.175	0.162	0.169
Clone D6	0.004	0.005	0.005	Clone D6	0.007	0.016	0.012	Clone D6	0.12	0.114	0.117
Clone C8	0.007	0.008	0.008	Clone C8	0.008	0.016	0.012	Clone C8	0.14	0.152	0.146
Clone C10	0.018	0.014	0.016	Clone C10	0.062	0.075	0.069	Clone C10	0.493	0.533	0.513

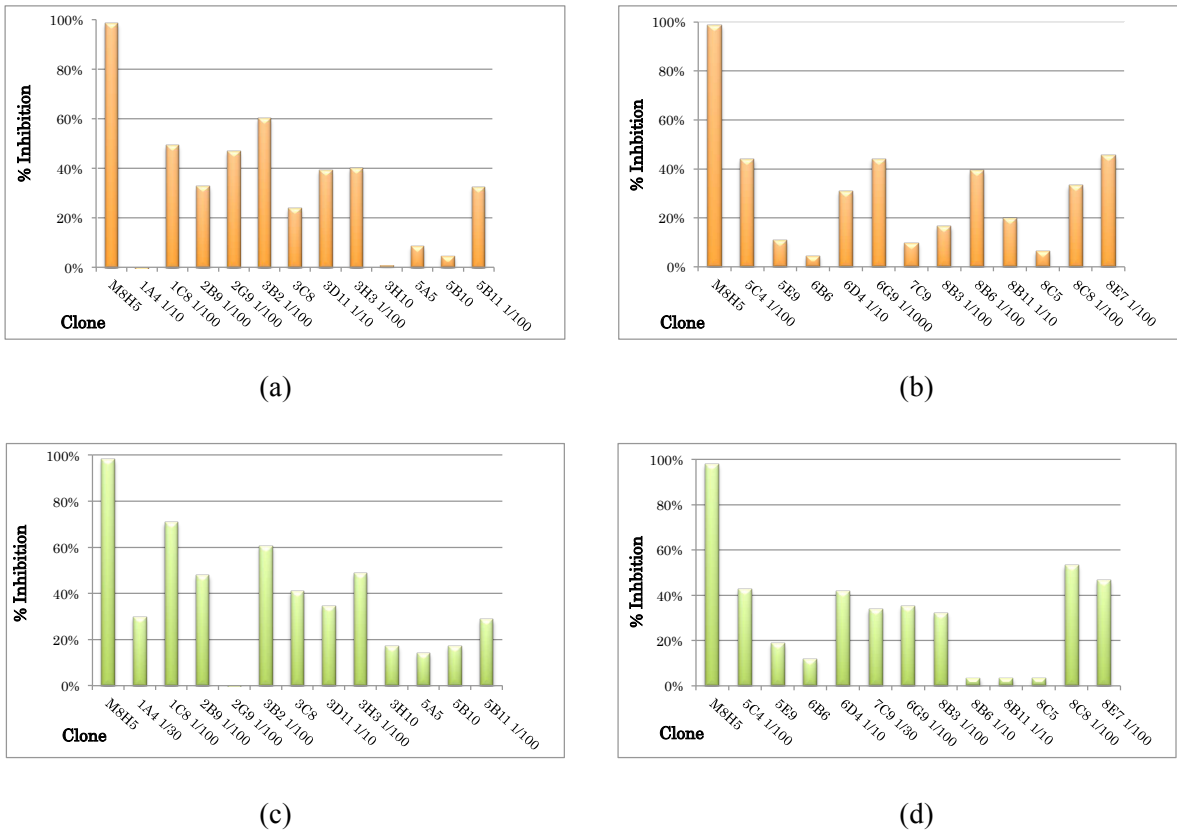
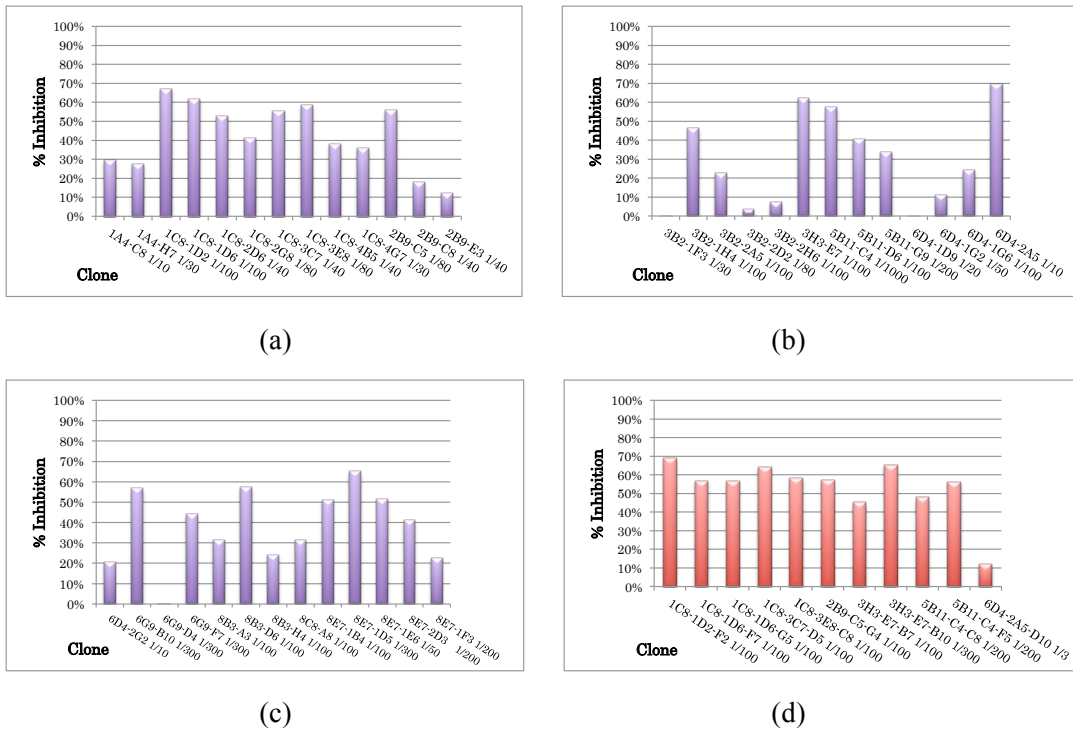


Figure 14 – ic-ELISA of positive wells (fusion) using (a and b) MC-LR 1µg/mL in buffer 0.1 M carbonate-bicarbonate pH 9.6 as coating or (c and d) MC-LR-KLH (DCC/NHS) 5µg/mL in PBS as coating solution and 1000 ng/mL of MC-LR in PBS as inhibitor. M8H5 was used as positive control.



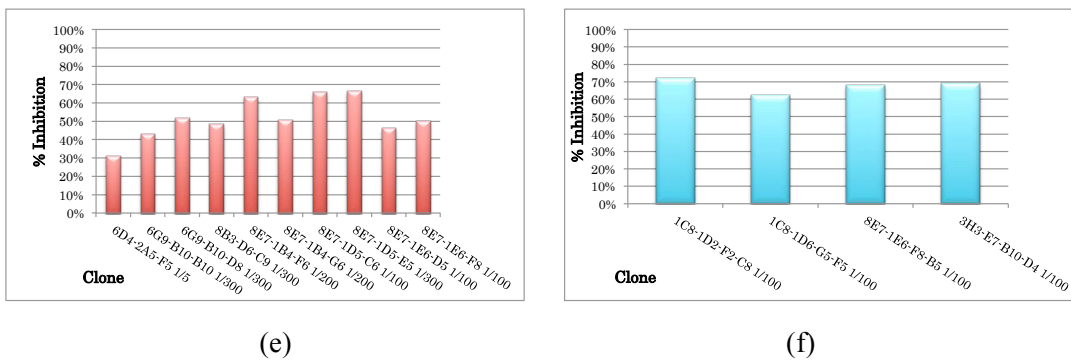


Figure 15 – ic-ELISA of positive clones using MC-LR-KLH (DCC/NHS) 5 µg/mL in PBS as coating solution and as inhibitor 1000 ng/mL of MC-LR in PBS. 1<sup>st</sup> cloning (a), (b) and (c); 2<sup>nd</sup> cloning (d) and (e); , 3<sup>rd</sup> cloning (f).

Table 3 – Cell viability and activity against MC-LR of selected clones in HT medium and GIT medium.

Clone	HT medium		GIT medium	
	% Viable*	% Inhibition**	% Viable*	% Inhibition**
1C8-3C7-D5	82	60	85	65
1C8-3E8-C8	89	73	84	61
5B11-C4-C8	73	52	89	64
5B11-C4-F5	75	53	87	62
6G9-B10-D8	84	53	79	52
8E7-1B4-F6	80	68	85	47
8E7-1D5-C6	82	66	82	54
8E7-1D5-E5	88	56	76	65

\* Count the viable and dead cell in supernatant using 0.25% Trypan blue in PBS.

\*\* ic-ELISA using as inhibitor 1000 ng/ml of MC-LR in PBS.

Table 4 - Cell viability and activity against MC-LR of selected clones in HY medium and GIT medium.

Clone	HY medium		GIT medium	
	% Viable*	% Inhibition**	% Viable*	% Inhibition**
1C8-1D2-F2-C8	81	68	87	54
1C8-1D6-G5-F5	87	62	90	55
3H3-E7-B10-D4	83	69	86	74
8E7-1E6-F8-B5	86	66	94	69

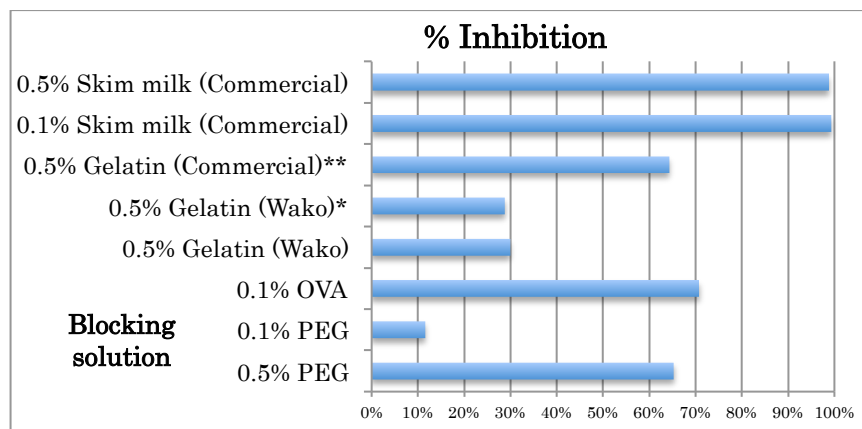
\* Count the viable and dead cell in supernatant using 0.25% Trypan blue in PBS.

\*\* ic-ELISA using as inhibitor 1000 ng/mL of MC-LR in PBS.

Table 5 – Viability of cloned cell, concentration of live cell, number of days when the cells was count after thawed and the number of times that the clone was thawed.

Clone	Cell Viability*	Viable Cell/mL	Days after thawed
1C8-3E8-C8	74%	$6 \times 10^6$	2
1C8-1D2-F2-C8	57%	$2 \times 10^6$	10
1C8-1D6-G6-F5	47%	$3 \times 10^6$	10
3H3-E7-B10-D4	86%	$2 \times 10^6$	6
5B11-C4-C8	85%	$4 \times 10^6$	9
6G9-B10-D8	81%	$5 \times 10^6$	4
8E7-1B4-F6	84%	$3 \times 10^6$	9
8E7-1D5-C6	84 %	$3 \times 10^6$	5
8E7-1E6-F8-B5	87%	$1 \times 10^6$	9

\* Count the viable and dead cell in supernatant using 0.25% Trypan blue in PBS.



\* Prepare at 60-70 °C /5 min

\*\*Prepare at 60-70 °C /15 min

\*\*\* Autoclaved

Figure 16 – Evaluation of blocking solution in ELISA aiming to select the solution that shows non-specific binding in plate.

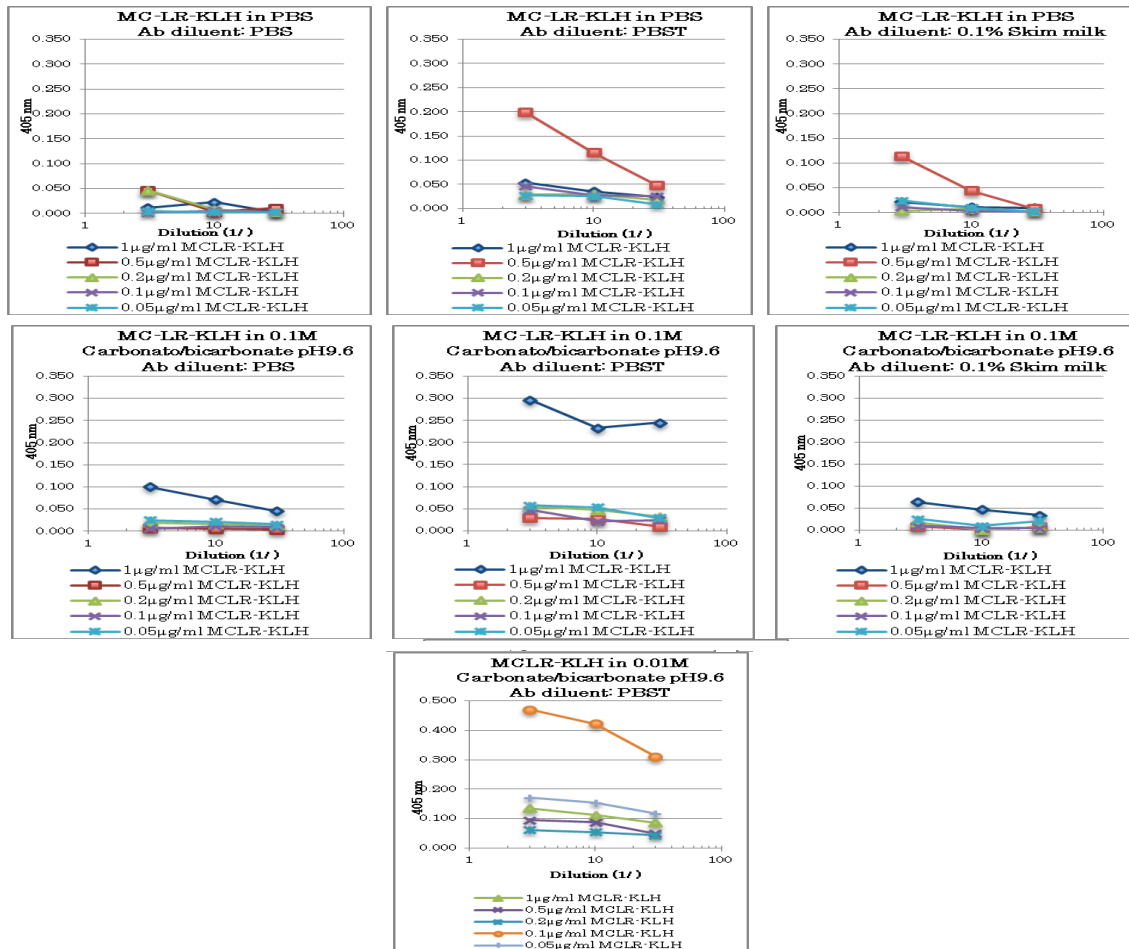


Figure 17 - Evaluation of concentration of MC-LR-KLH (1 to 0.05 µg/mL), diluent coating solution (PBS and 0.1 or 0.01M Carbonate/bicarbonate pH9.6 buffer) and diluent antibody solution (PBS, PBS/Tween and blocking solution) for optimization of ELISA.

Table 6 – Comparison of development of color system, horseradish peroxidase (HPR) with TMBZ or alkaline phosphatase (ALP) with pnPP.

Clone	HPR-TMBZ (450 nm)	ALP-pNPP (405 nm)
1C8-3E8-F8	0.253	0.585
3H3-E7-B10-D4	0.795	1.990
5B11-C4-C8	0.403	1.387
6G9-B10-D8	0.623	1.625
8E7-1B4-F6	0.352	1.222
8E7-1D5-C6	0.428	1.429
8E7-1E6-F8-B5	0.366	1.197
<b>M8H5</b>	<b>0.062</b>	<b>0.197</b>

## **CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-MICOTOXINA (AFLATOXINA E ZEARALENONA) UTILIZANDO LINHAGEM AF.2 E ZEN.2**

### **INTRODUÇÃO**

O monitoramento da presença de micotoxinas em alimentos necessita de métodos de detecções analíticas que sejam sensíveis, específicos, exatos e precisos. Um método desejável, além de ter essas características, tem que ser de uso fácil, rápido e econômico. A vinda de tecnologias emergentes em métodos rápidos para a detecção de resíduos tóxicos consiste, principalmente, em sistemas baseados em interação antígeno-anticorpo. Os métodos imunoquímicos surgiram como alternativa biotecnológica para minimizar o custo de análise, com destaque atual à coluna de imunoafinidade para limpeza. O uso de anticorpo monoclonal (AcM) apresenta vantagens devido a produção ilimitada, caracterizada pela alta especificidade, uniformidade e afinidade constante a um único epítipo.

A produção em larga escala de anticorpo monoclonal destinado a aplicação visando diagnóstico, terapia e outros interesses tecnológicos estimulou a melhoria do processo fundamentado no cultivo de hibridoma em meio artificial (TINTÓ et al., 2002.; BIRCH e RACHER, 2006). Sendo uma opção economicamente viável e segura à produção em grande escala no sistema de produção *in vitro* (ILAR, 1999). Este capítulo destinou-se à produção de AcM em meio sintético visando aplicação em métodos imunoquímicos, como ELISA, que é uma alternativa para análise de triagem de aflatoxinas e zearalenona em amostras, minimizando o custo e tempo no controle e segurança em alimentos.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1 Material**

AcM anti- AFB<sub>1</sub> (linhagem AF.2 com 133 % de reatividade cruzada com AFB<sub>2</sub>) previamente preparado por Kawamura *et al.* (1988); AcM anti-ZEA (linhagem ZEN.2) previamente preparado por Kawamura e Emoto (2006); AFB<sub>1</sub> (A6636), AFB<sub>1</sub>-BSA (A6655), Zearalenona (Z2125), anticorpo IgG anti-*mouse*-HPR (A4416), ovalbumina (A538), albumina bovina (4378), TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina) (T0440), *coomassie brilliant blue* R (B0630), corante vital Azul de Trypan (T6146), saco para diálise (membrana de celulose) (D9777) (Sigma Chemical Co., USA); microplaca de 24 orifícios, criotubo (Corning, USA); filtro de microfibras de vidro (GF/C 2,5 cm i.d) (Whatman International Ltd., UK); meio RPMI 1640 (31800-04), meio *Hybridoma*-SFM (*serum free medium*) (12300-067) soro fetal bovino (SFB) (312657-029), penicilina-estreptomicina líquido (5000 U/mL de penicilina G e 5000 µg/mL de estreptomicina) (15070-063), L-glutamina (21051-024) (Gibco Co., USA); sulfato de amônio (Synth, Brasil, S1051.01.AG); frascos para cultivo de células de 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup> (TPP, Suíça); membrana GS em éster de celulose (0,22 µm de poro, 2,5 mm i.d.) (Millipore Corp., USA); membrana de acetato de celulose regenerado (Schleier and Schuell, Alemanha); HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfônico) (7365-45-9, Acros Organics, USA.); sulfato de gentamicina (80 mg/mL) (Schering Corporation, USA); marcador molecular BenchMark™ Protein Ladder (10747-012, Invitrogen, USA); metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA); água ultrapura (Purelab® Classic UF, Elga Labwater Global Operation, UK); recipiente para congelamento de criotubos (*Bio Freezing Vessel*, Bicell, Nihon Freezer Co., Japão); recipiente de nitrogênio líquido a -185 °C (Cryo Diffusion, França).

Equipamentos: agitador magnético (Fisatom, Brasil); banho a 37 °C; banho ultrassônico (*Ultrasonic cleaner* Unique); câmara de Neubauer (Inlab, Brasil); centrífuga (EV:250-M, Evlab, Brasil); centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, 3805 03551, Alemanha); cuba para eletroforese (Mighty Small II SE 250/SE260, Hoefer Pharmacia Biotech, Inc., USA);

espectrofotômetro UV-VIS (Libra S22, Biochrom Ltd, UK); freezer (-85 °C) (CFC FREE, Sanyo, USA); fluxo laminar (Clean Plus CL FV-09, Veco, Brasil); incubadora sob 5 % CO<sub>2</sub> (modelo 3110, Forma Scientific, USA); N<sub>2</sub> gasoso; leitora de ELISA (Expert Plus, Asys, Cambridge, Reino Unido); microscópio invertido (Lamba LGD2, ATTO Instruments Co., China).

## 2 Cultivo de hibridoma em meio

### 2.1 Linhagem AF.2

O hibridoma linhagem AF.2 secretor de AcM específico para AFB<sub>1</sub> (isotipo IgG<sub>1</sub> lambda), derivada de mieloma linhagem SP2/0-Ag14 e a célula esplênica de camundongo BALB/c foram produzidas por Kawamura *et al.* (1988) em *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo* e mantidas em *Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão*.

Tabela 7 – Reatividade cruzada com análogos de aflatoxinas do AcM produzido pela linhagem AF.2

AFLATOXINA	Reatividade Cruzada (%)
B <sub>1</sub>	100
B <sub>2</sub>	133
G <sub>1</sub>	13,4
G <sub>2</sub>	14,7
AFL I <sup>a</sup>	2
AFL II <sup>b</sup>	5,5
M <sub>1</sub>	0,9
Q <sub>1</sub>	>0,5
P <sub>1</sub>	0,9
B <sub>2a</sub>	>0,5

<sup>a</sup> AFL I, isômero natural de [1S]-aflatoxicol

<sup>b</sup> AFL II, isômero natural de [1R]-aflatoxicol

Fonte: Kawamura *et al.*, 1988

### 2.2 Linhagem ZEN.2

O hibridoma linhagem ZEN.2 secretor de AcM específico para Zearalenona (isotipo IgG<sub>2</sub> kappa), derivada de mieloma linhagem SP2/0-Ag14 e a célula esplênica de camundongo BALB/c foram produzidas por Kawamura e Emoto (2006) em *Faculty of Agriculture, Kagawa University*, Japão.

Tabela 8 – Reatividade cruzada com análogos de zearalenona do AcM produzido pela linhagem ZEN.2

ZEARALENONA	Reatividade cruzada (%)
ZEA	100
$\alpha$ -Zearalenol	60
$\beta$ -Zearalenol	5,7
$\alpha$ -Zearalanol	7,1
$\beta$ -Zearalanol	0,9

Fonte: Kawamura e Emoto, 2006.

O esquema geral do cultivo celular foi descrito na Figura 18. Os hibridomas estocados a -185 °C em nitrogênio líquido foram recuperados por descongelamento rápido do criotubo em banho a 37 °C, lavados com 10 mL de meio RPMI a 37 °C e centrifugados (200x g, 5 min). Descartado o sobrenadante, as células da linhagem AF.2 foram ressuspendidas em meio *Hybridoma-SFM* (H-SFM) com 50 % SFB, 10 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina para estimular a recuperação do hibridoma congelado. Enquanto que a linhagem ZEN.2 foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 50 % SFB, 10 mM de L-glutamina, 23 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES e 40 µg/mL de gentamicina. O cultivo procedeu-se em microplaca de 24 orifícios e frasco de 25 cm<sup>2</sup> a 37 °C com 5 % CO<sub>2</sub>.

Periodicamente, as células recuperadas foram avaliadas por microscopia quanto às características morfológicas, quantidade (1) e viabilidade celular (2), utilizando-se corante vital Azul

de Trypan (0,25 % em meio RPMI, p/v, Acros Organics, USA), calculada e expressa em porcentagem:

$$\text{Células viáveis/mL} = \frac{\text{Total de células viáveis} \times 2 \times 10^4}{\text{Número de quadrantes}} \quad (1)$$

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{células viáveis} \times 100}{\text{células totais}} \quad (2)$$

Posteriormente, procedeu a expansão celular para frascos de cultivo de 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup>, assim como diminuição gradativa de SFB até ausência e de L-glutamina até 2mM para linhagem AF.2. A linhagem ZEN.2 foi mantida em RPMI com diminuição de SFB para 10 % e de L-glutamina para 2mM.

A produção de AcM foi realizada em cultivo estático por aproximadamente 4-7 dias sem reposição de meio e o sobrenadante de cultivo (contendo os AcM), centrifugado (2400x g, 10 min, 4 °C) para remover material celular, sendo seu volume total avaliado quanto à concentração proteica por Bradford e atividade anti-micotoxina.

## **2.3 Purificação parcial de anticorpo monoclonal IgG antiAFB<sub>1</sub>**

### **2.3.1 Precipitação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

O sobrenadante de cultivo com Ac foi adicionado de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sob agitação lenta até concentração final de 60 % de saturação para precipitação e purificação parcial de IgG. O precipitado proteico obtido foi mantido a 4 °C por 16 h sob agitação, filtrado em membrana de acetado de celulose regenerado, transferido para saco de diálise (KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*).

### **2.3.2 Diálise de proteína**

O concentrado proteico precipitado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi dissolvido em menor quantidade possível de PBS. A diálise (*cut-off* de 12000-16000 MM, tamanho 25 mm x 16 mm) realizou-se empregando PBS (6x 1 L) a 4 °C por 72 h. A concentração proteica (IgG) foi determinada no

sobrenadante pós-diálise e atividade do AcM averiguado por i-ELISA (Figura 19)

#### **2.4 Determinação de Proteína – Método de Bradford**

A concentração proteica foi determinada por método de Bradford (1976) sob forma de microensaio (microplaca com 96 orifícios). Para confecção da curva padrão de proteína, empregou-se 10 $\mu$ L de soro albumina bovina (BSA, Initial fractionation by cold alcohol precipitation  $\geq$  97 % albumin, Sigma, USA) nas concentrações de 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500  $\mu$ g/mL (suspendida em PBS 0,015M pH 7,3), tendo PBS como branco da reação. Um volume de 100  $\mu$ L do reativo de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi adicionado à reação e lida a 650 nm após 20 minutos.

#### **2.5 Presença e Atividade anti-micotoxina dos anticorpos monoclonais produzidos – Imunoensaios**

Presença de IgG anti-micotoxina produzido nos sobrenadantes de meio sintético *Hybridoma*-SFM foi determinado por i-ELISA (Ensaio imunoenzimático indireto) e para confirmar atividade anti-micotoxina dos AcM, realizou-se ic-ELISA (Ensaio imunoenzimático indireto competitivo), sendo o protocolo similar ao descrito por Kawamura *et al.* (1988).

As microplacas foram sensibilizadas com 50 ou 100  $\mu$ L de AFB<sub>1</sub>-BSA (250 ng/mL, PBS 0,015 M pH 7,3) ou 50 ou 100  $\mu$ l de ZEA-EDPC-OVA (5  $\mu$ g/mL , tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6) e incubadas a 4 °C por 18 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), bloqueadas com 100 ou 200  $\mu$ L solução ovalbumina 0,1 % em PBS e incubadas por 1 h a 25 °C. Após 3 lavagens com PBST, adicionou-se 50  $\mu$ L de sobrenadante do cultivo ou dialisado com fator de diluição de 1 a 10<sup>6</sup> e incubadas a 25 °C por 1 h. Para ic-ELISA, adicionou-se 50  $\mu$ L de padrão de micotoxina e 50  $\mu$ L de AcM. Após 3 lavagens com PBST, adicionou-se 50  $\mu$ L de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* diluído a 2:10<sup>3</sup> em PBST e incubadas a 25 °C por 1 h. Após 3 lavagens, duas vezes com PBST, adicionou-se 100  $\mu$ L da solução de substrato

cromógeno TMB por 30 min a 25 °C e, a reação enzimática interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e absorvância lida a 450 nm.

## 2.6 Eletroforese em SDS-PAGE

Para avaliar a pureza e quantidade de AcM produzido, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), descrita por LaemmLi (1970). O AcM (1 mg/mL) foi diluído em tampão de amostra 2 vezes concentrado e, alíquota de correspondente a 2,5 e 5 µg de proteína, aplicada no gel paralelamente com 10 µL do padrão de marcador molecular. O gel de concentração (*stacking*) foi de 5 % de acrilamida, enquanto que de corrida (*running*), 12 %. Após corrida por 4h sob 100 V, o gel foi corado com solução de *Coomassie blue* e descorado com ácido acético:metanol:H<sub>2</sub>O (1:4:5) para a visualização e distinção de bandas proteicas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de cultivo celular de hibridoma foi elaborado a partir de dissertações e teses realizadas no laboratório (FUJII, 2007; HAYASHI, 2007; TAKABAYASHI, 2009; SANTOS, 2009; DORO SILVA, 2010; ISHIKAWA, 2012), em que avaliou o funcionamento dos hibridomas e aprimorar o estudo.

Fujii (2007) constatou que após 2 dias do pós-descongelamento celular, a expansão celular apresentou crescimento de fator de 3 vezes, e nos próximos dias foram observados aumento de 60 vezes na contagem celular e comprovada a atividade anti-ocratoxina Ishikawa (2012) acompanhou o cultivo celular por 63 dias, registrando a viabilidade e contagem celular da linhagem OTA.1, demonstrando baixa viabilidade no início do cultivo, com aumento de viabilidade maior de 90 % e contagem celular em torno de 10<sup>6</sup> cél./mL nos 6<sup>o</sup> a 10<sup>o</sup> dia, nos dias seguintes a viabilidade variou de 50,2 a 91,7 % e contagem entre 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> cél./mL.

Hayashi (2007) observou viabilidade celular pós-descongelamento de 14,6 % em linhagem AF.4, assim como Takabayashi (2009) averigou baixa viabilidade, sendo AF.2 de 4,3 % e AF.4 de 3,9 %. Os fatores prejudiciais à viabilidade celular consistem da exaustão de nutrientes, acúmulo de compostos indesejáveis provenientes do metabolismo, restrição de oxigênio e CO<sub>2</sub> devido ao longo período congelado (LEGAZPI et al., 2005). Soma-se ainda, o uso de DMSO como agente crioprotetor, capaz de injuriar células devido à interação com membrana celular. Visto que viabilidade celular no dia do descongelamento apresenta baixo valor, passou a realizar a primeira contagem celular após 2 ou 3 dias de cultivo e assim decidir por qual protocolo seguir.

O aumento da porcentagem de SFB (de 10-20 % para em torno de 50 %) e da concentração de L-glutamina (de acordo com crescimento celular) auxiliou na recuperação e expansão celular do pós-congelamento. A suplementação de meio com SFB na recuperação do hibridoma confere fatores hormonais de estimulação e proteínas para transporte de hormônios, minerais, lipídios e outros fatores naturais essenciais na multiplicação celular (AYBAY e IMIR, 2000; LEGAZPI et al., 2005; EVEN et al., 2006). O acréscimo de L-glutamina no meio tem sido fundamental no cultivo, constituindo-se em fonte primária de nitrogênio (LEGAZPI et al., 2005; OKESON e RILEY, 2001).

A introdução de reagentes, como HEPES e gentamicina, estabilizou o meio de cultura e evitou contaminações bacterianas, respectivamente. O cultivo em RPMI dispõe de 2 tampões, bicarbonato de sódio e HEPES, garantindo maior tempo de estabilidade por manter pH fisiológico, mesmo sob mudança na concentração de CO<sub>2</sub> devido a respiração celular (BAICU e TAYLOR, 2002). A fim de inibir contaminação bacteriana durante o cultivo em RPMI, o uso recomendando de até 50 µg/mL de gentamicina tem favorecido a expansão celular (HARLOW e LANE, 1988).

Embora, cultivo de hibridomas em meio sintético forneça baixa concentração de IgG (50 µg/mL) (HARLOW e LANE, 1988), o cultivo em meio H-SFM visou eliminar problemas inerentes ao

uso de SFB, i.e. diminuir o custo do reagente, heterogeneidade entre lotes e alto teor proteico, que interfere na purificação de AcM (LEGAZPI et al., 2005; EVEN et al., 2006).

O uso de água ultrapura, fresca e de ótima qualidade, para preparo de meio de cultura também foi crucial para o aprimoramento do cultivo, assim como o modo de preparo. A aplicação de H-SFM para recuperação celular, anteriormente feito com RPMI, a fim de diminuir custo de produção, foi introduzida por auxiliar na rapidez de produção de AcM com maior pureza.

Doro-Silva (2010) estudou a purificação utilizando 40 a 60 % de saturação de sulfato de amônio, observando que 60% de saturação, proporciona maior precipitação de proteínas, conseqüentemente mais Ac.

### **1. Anticorpo monoclonal anti-aflatoxina**

Após 3 dias de cultivo, o crescimento celular da linhagem AF.2 atingiu fase estacionária de crescimento celular, apresentando viabilidade celular de 93 %, com contagem celular de  $1,4 \times 10^6$  células/mL (Figura 20). Após 11 dias de cultivo, a contagem celular aumentou para  $2,65 \times 10^6$  células/mL com 88 % de viabilidade.

A proposta inicial para aprimorar o cultivo celular em nosso Laboratório era cultivar diretamente em H-SFM. Contudo, o experimento não foi bem-sucedido, tendo que suplementar SFB no meio. SFB é importante no cultivo celular por conferir fatores hormonais de estimulação e proteínas para transporte de hormônios, minerais, lipídios e outros fatores naturais essenciais na multiplicação celular (AYBAY e IMIR, 2000; LEGAZPI et al., 2005; EVEN et al., 2006).

O meio H-SFM suplementado com SFB eliminou a etapa de reativação celular e adaptação para meio, anteriormente padronizado. A diminuição gradual de SFB no meio até ausência foi rápida, simplificando o controle no desenvolvimento de cultivo celular, principalmente perante a facilidade na

purificação de AcM.

A fim de diminuir o uso de sulfato de amônio, foi testada a ultra-filtração para concentração proteica antes da etapa de precipitação do sobrenadante do cultivo. Entretanto, apesar de diminuir o volume do sobrenadante em 10 vezes, a concentração proteica não foi na mesma proporção, 39,4  $\mu\text{g/mL}$  para 71,9  $\mu\text{g/mL}$ , demonstrando perda de proteína durante o processo.

Após diálise, produção estimada de proteína foi de 935  $\mu\text{g/mL}$  (100 mL de dialisado), pureza (Figura 21) e avaliação da atividade anti-AFB<sub>1</sub> de AcM produzido (Figura 22 e 23) foram analisadas no sobrenadante de cultivo da linhagem AF.2.

Eletroforese em SDS-PAGE foi realizada para analisar a pureza de AcM produzido, em que o uso de mercaptoetanol (agente redutor) e temperatura (98 °C) no preparo das amostras (IgG) rompem as pontes dissulfeto, visualizando no gel cadeias pesadas (50 kDa) e cadeias leves (25 kDa) (BOENISCH, 2001). O resultado confirmou presença das bandas de  $\pm 50$  kDa e  $\pm 25$  kDa, sendo de alta pureza o anticorpo produzido em termos de proteína. Além disso, observamos banda de  $\pm 80$  kDa, inferindo que a quebra das pontes de dissulfetos entre as cadeias leve e pesada não foram completas.

Cinquenta por cento da máxima ligação dos anticorpos (IC<sub>50</sub>) produzidos calculado no i-ELISA, em torno do título de 1:10000, correspondendo a 94 ng/mL, foi o título empregado no ic-ELISA. O ic-ELISA mostrou adequado perfil de atividade anti-AFB<sub>1</sub> para aplicação em métodos para detecção de AF empregando anticorpo.

## **2. Anticorpo monoclonal anti-zeralenona**

O crescimento celular da linhagem ZEN.2, diferentemente da AF.2, foi mais lento, sendo confirmada a fase estacionária de crescimento celular, após 12 dias de cultivo, apresentando viabilidade celular de 93 %, com contagem celular de  $5 \times 10^6$  células/mL. No 16º dia, último dia de

acompanhamento da contagem, apresentou 87 % de viabilidade e  $5,6 \times 10^6$  células/mL (Figura 24).

O hibridoma ZEN.2 foi cultivado em meio RPMI 1640 suplementado com 50 % SFB, sendo reduzido até 10 % para cultivo, 10 mM de L-glutamina, 23 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES e 40  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina. O meio RPMI, por ser suplementado com SFB para cultivo, não apresenta benefícios técnicos e de segurança como o meio H-SFM, porém, é um meio de custo menor e reativação celular ágil quando o hibridoma é congelado neste meio. Almejando a rápida reativação celular, a linhagem ZEN.2 foi cultivado em RPMI, entretanto, não obtivemos sucesso no propósito.

Após diálise, produção estimada de proteína foi de 2,06 mg/mL (30 mL de dialisado) devido ao uso de SFB, sendo analisadas no sobrenadante de cultivo, a pureza (Figura 25) e atividade anti-ZEA de AcM produzido (Figura 26 e 27).

Eletroforese em SDS-PAGE do AcM produzido confirmou presença das bandas de  $\pm 55\text{kDa}$  e  $\pm 25\text{kDa}$ , além de outras bandas, devido aos 10 % de SFB presente no meio de cultura. Não houve necessidade de purificação completa do AcM, já que SFB apresenta baixo teor de IgG (HARLOW e LANE, 1988), minimizando interferência desses na aplicação em imunoenaios. Cinquenta por cento da máxima ligação dos anticorpos (IC50) produzidos calculado no i-ELISA (1:200, correspondendo a 10,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi o título empregado no ic-ELISA. O ic-ELISA mostrou perfil satisfatório de atividade anti-ZEA para aplicação em métodos para detecção de ZEA empregando anticorpo.

Os AcM produzidos (contra aflatoxinas e zearalenona) e disponíveis (contra ocratoxina A e Desoxinivalenol) foram testados para conferir a reatividade cruzada em relação aos conjugados (AFB1-BSA, DON-HG-OVA, ZEA-OVA e OTA-BSA) (Figura 28), a fim de aplicá-los em métodos imunológicos confiáveis. A Figura 28 apresenta baixa reatividade cruzada entre AcM e os conjugados não correspondentes, demonstrando altas especificidades e boas perspectivas na implementação de ensaios empregando estes anticorpos.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados demonstraram que os AcM produzidos em meios sintéticos pelas linhagens AF.2 e ZEN.2 contra aflatoxinas e zearalenona, respectivamente, são específicos e apresentam reatividade cruzada mínima contra DON, OTA e, ZEA ou AF, dependendo do AcM; somando-se a alta pureza do AcM anti-AF. Assim sendo, os AcM produzidos são satisfatórios para serem destinados ao uso em métodos imunoquímicos.

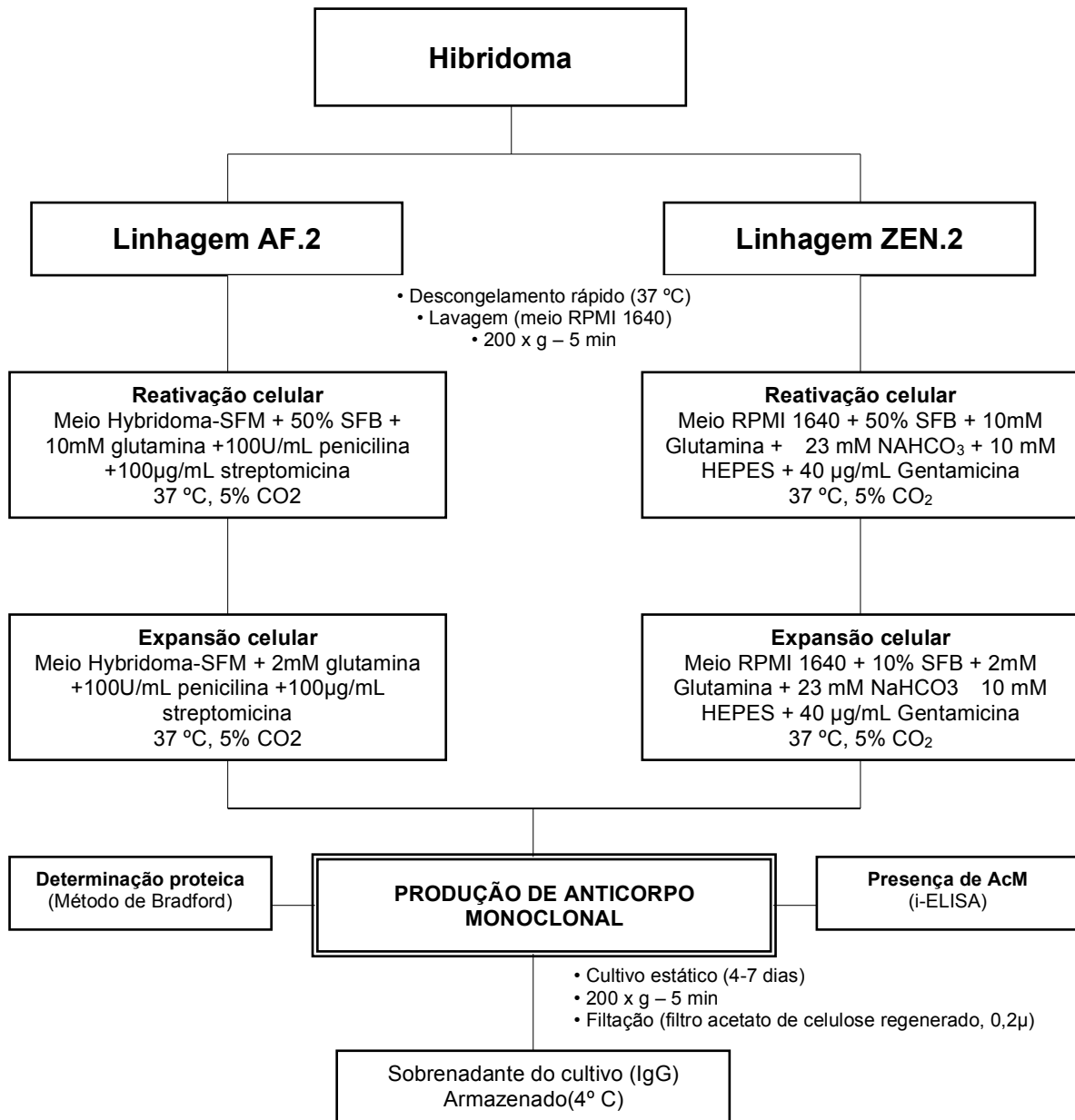


Figura 18 – Esquema de cultivo celular em meio sintético (H-SFM e RPMI 1640 suplementado com SFB) para produção de anticorpo monoclonal.

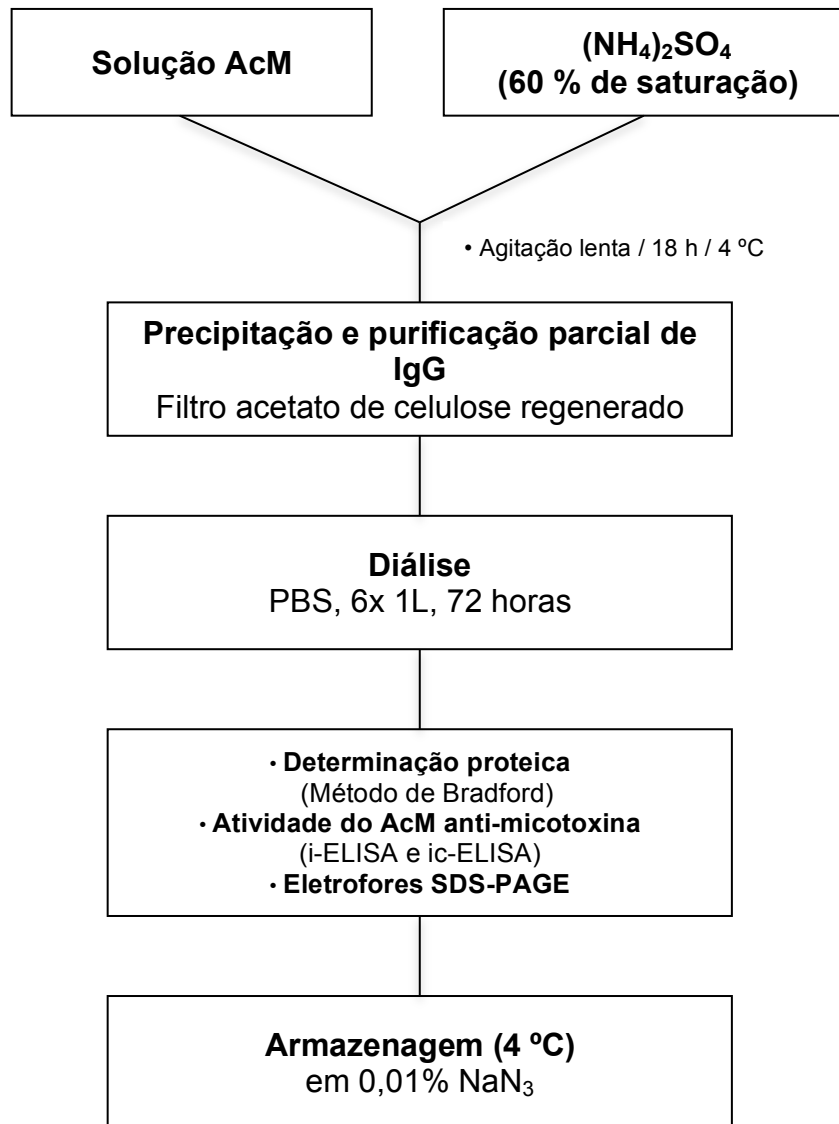


Figura 19 – Esquema da purificação de AcM produzido

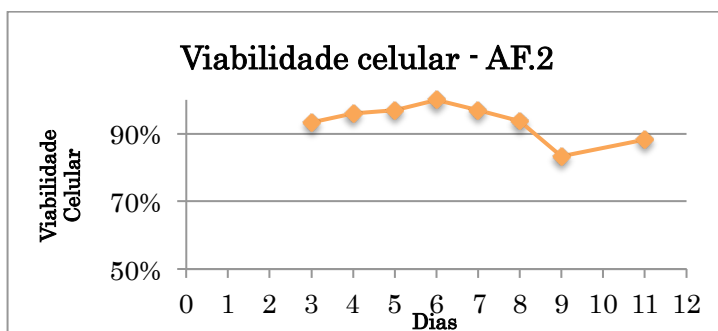


Figura 20 – Viabilidade celular durante o início da cultura celular da Linhagem AF.2 produtor de anticorpo monoclonal anti-AF em meio H-SFM suplementado com SFB.

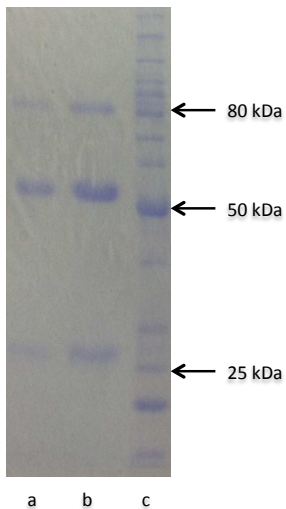


Figura 21 – Eletroforese SDS-PAGE de anticorpo produzido em meio H-SFM pela linhagem AF.2 dialisado. (a) dialisado correspondente a 2,5  $\mu\text{g}$  proteína; (b) dialisado correspondente a 5  $\mu\text{g}$  proteína; (c) marcador de proteína (BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder, Invitrogen, USA).

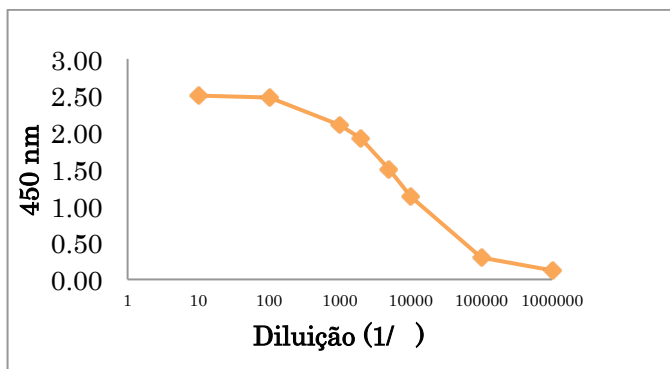


Figura 22 - Determinação de atividade anti-AFB<sub>1</sub> por i-ELISA dos AcM produzidos por hibridoma linhagem AF2 em meio H-SFM. O AcM foi diluído no fator de 10 a 10<sup>6</sup> em PBS.

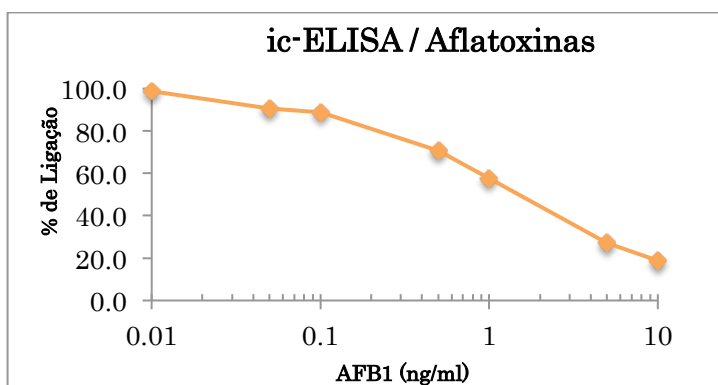


Figura 23 – Avaliação da atividade de AcM anti-AFB<sub>1</sub> produzidos em meio H-SFM por ic-ELISA. Padrão de AFB<sub>1</sub> nas concentração de 0,01 a 10 ng/mL em PBST:MeOH (9:1, v/v) foram utilizadas na curva. % de ligação foi calculada em porcentagem pela razão entre média de absorvância na presença de padrão pela média da absorvância na ausência de toxina.

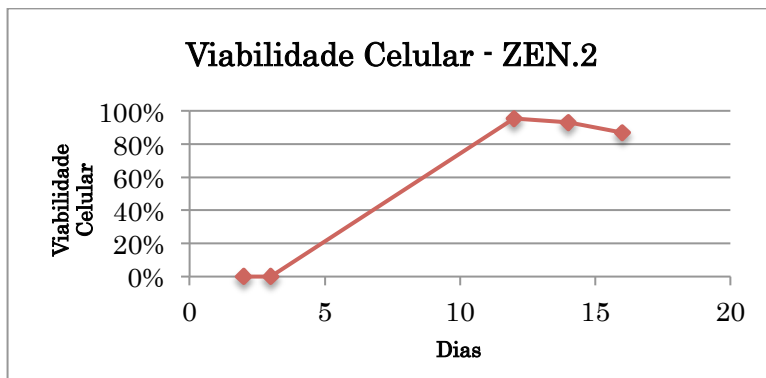


Figura 24 – Viabilidade celular durante o início da cultura celular da Linhagem ZEN.2 produtor de anticorpo

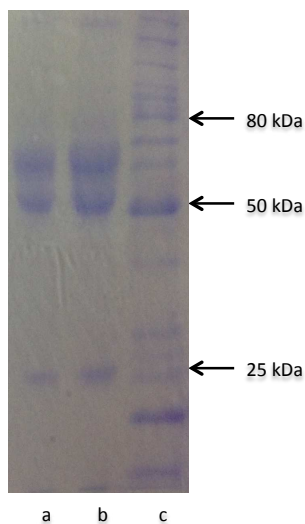


Figura 25 – Eletroforese SDS-PAGE de anticorpo produzido em meio H-SFM pela linhagem ZEN.2 dialisado. (a) dialisado correspondente a 2,5 µg proteína; (b) dialisado correspondente a 5 µg proteína; (c) marcador de proteína (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen, USA).

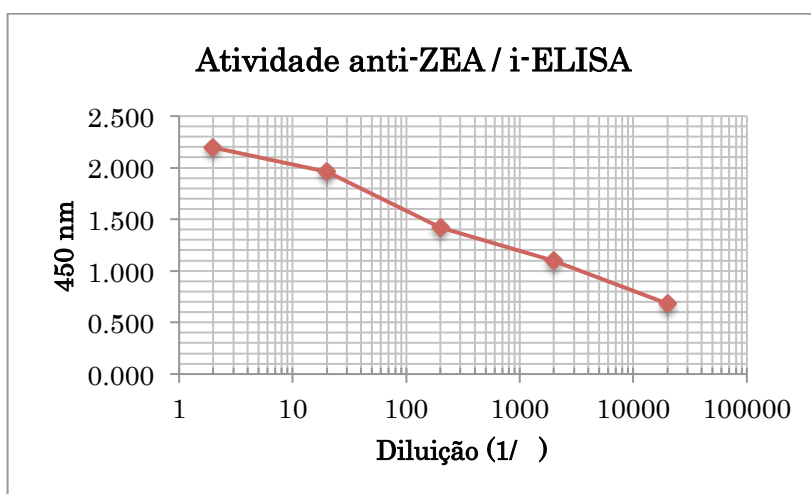


Figura 26 - Determinação de atividade anti-ZEA por i-ELISA dos AcM produzidos por hibridoma linhagem ZEN.2 em meio H-SFM. O AcM foi diluído no fator de 2 a  $2 \times 10^4$  em PBS.

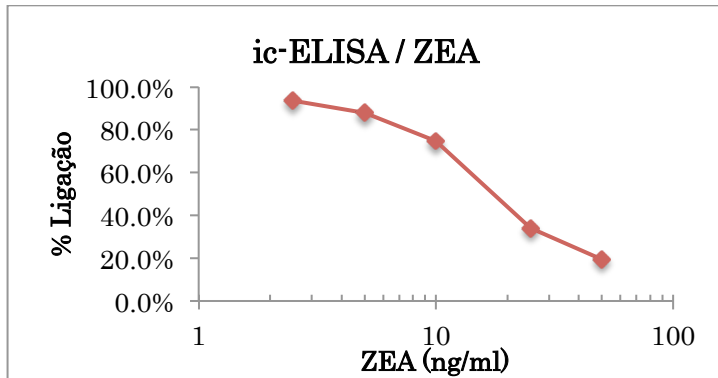


Figura 27 – Avaliação da atividade de AcM anti-ZEA produzidos em meio H-SFM por ic-ELISA. Padrão de ZEA nas concentrações de 2,5 a 50 ng/mL em PBST:MeOH (9:1, v/v) foram utilizadas na curva. % de Ligação foi calculada em porcentagem pela razão entre média de absorvância na presença de padrão pela média da absorvância na ausência de toxina.

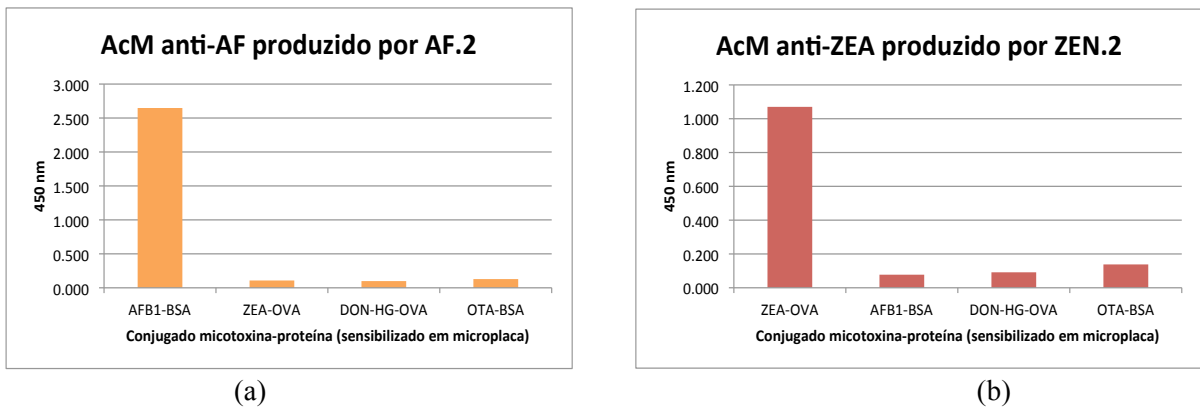


Figura 28 – Teste de reatividade cruzada entre anticorpos e conjugado (toxina-proteína) disponíveis no laboratório. (a) AcM anti-AF e (b) AcM anti-ZEA foram diluídos em PBS (1:200). As concentrações de conjugados para sensibilização em microplaca foram 5 µg/mL de ZEA-OVA; 2 µg/mL de DON-HG-OVA; 250 ng/mL de AFB1-BSA; diluição de 1:30000 de OTA-BSA.

### **CAPÍTULO 3: ELISA COMPETITIVO INDIRETO PARA ANÁLISE DE AFLATOXINAS, DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM DIFERENTES ALIMENTOS**

#### **INTRODUÇÃO**

O desenvolvimento de método analítico sensível, específico, confiável e preciso, aliado a facilidade no uso, rápido e econômico tem sido crucial para o monitoramento eficiente de micotoxinas. O ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) se destaca entre os pioneiros na triagem rápida para o controle de qualidade (ANKLAM et al., 2002; CALLERI, 2007; XIULAN et al., 2006).

As vantagens de imunoensaio são: especificidade devido à ligação seletiva entre anticorpo-antígeno, rapidez, simplicidade, adaptabilidade, não requer exaustiva limpeza do extrato e, permite análise simultânea de dezenas de amostras em microplaca (LEE et al., 2004; PITTET, 2005; SAHA et al., 2007; KRŠKA et al., 2008). As limitações consistem na desnaturação da integridade estrutural de anticorpo (Ac) e resultado falso-positivo devido à reação cruzada, oriunda da ligação de Ac com os interferentes de matrizes alimentares e/ou inibição da atividade enzimática, requerendo procedimentos confirmatórios (ANKLAM et al., 2002; LEE et al., 2004; PITTET, 2005; CALLERI et al., 2006; PRIETO-SIMÓN et al., 2007; CHO et al., 2008).

Visando aplicar o AcM produzido no capítulo antecedente (AcM anti-AF e anti-ZEA), assim como o AcM anti-DON produzido, procedeu-se a implementação e otimização da análise de Aflatoxinas, Desoxinivalenol e Zearalenona em trigo, biscoito e milho.

#### **MATERIAL E MÉTODOS**

##### **1 Material**

AcM anti-aflatoxinas, zearalenona (hibridoma AF.2 e ZEN.2, capítulo 2) e AcM

anti-desoxinivalenol (DON.3, SANTOS et al., 2011). ZEA-OVA (reação com EDPC) e DON-HG-OVA (DON- Hemissuccinato-Ovoalbumina), cedidos gentilmente por Dr. Kawamura, Kagawa Universty. Os reagentes de Sigma Chemical Co., USA foram AFB<sub>1</sub> (A6636), AFB<sub>1</sub>-BSA (5 mg liofilizado, A6655), conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* (IgG anti-*mouse*-HPR) (A4416), Zearalenona (Z2125), Desoxinivalenol (D0156), ovalbumina (A538), albumina bovina (4378), 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina (TMB) (T2885), peróxido de hidrogênio 30 % (H1009), PEG 8000 (89510), ácido trifluoroacético 99.8% (TFA) (302031). Outros: microplaca de 96 orifícios (Corning, USA); cloreto de sódio grau P.A. (Synth, Brasil); metanol e acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, USA); água ultrapura (Purelab® Classic UF, Elga Labwater Global Operation, UK); Filtro de celulose Whatman nº1 e filtro de microfibras de vidro GF/C 2,5 cm i.d (Whatman International Ltd., UK); acetato de sódio (NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O) (Mallinckrodt Inc., USA); leite desnatado (Molico-Nestlé®, Araçatuba, Brasil); Coluna de imunoafinidade (AflaTest, DONTest e ZearalaTest, Vicam Inc., Watertown, USA); coluna LUNA C-18, 250x4,6 mm, 5µ, 100 Å (00G-4252-EO) e coluna de guarda Security Guard (KJO-4282, Phenomenex, USA).

Equipamentos: agitador magnético (Fisatom, Brasil); banho a 40 °C; banho ultrassônico (Ultrasonic cleaner Unique, Brasil); centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, 3805 03551, Alemanha); espectrofotômetro UV-VIS (Libra S22, Biochrom Ltd, UK); freezer -85 °C (CFC FREE, Sanyo, USA); cromatógrafo modelo Prominence (Shimadzu, Japão); leitora de ELISA (Expert Plus, Asys, Cambridge, UK); Incubadora refrigerada com agitação (MA830/A, Marconi Equipamentos para Laboratório, Brasil); Lavadora de microplaca (MOD BSII, Bras-Serum®, SP, Brasil).

## **2. ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) para detecção de Aflatoxina**

### **2.1. Otimização de conjugado AFB<sub>1</sub>-BSA**

O conjugado AFB<sub>1</sub>-BSA na concentração de 100, 250, 500 e 1000 ng/mL em tampão PBS 0,015 M pH 7,3 foi empregado na sensibilização de microplaca e avaliado por i-ELISA (AcM, 1:10 a 1:10<sup>6</sup>) em triplicata.

### **2.2. Otimização de AcM anti-AF e conjugado anti-IgG-HRP**

A diluição ótima de AcM foi determinada, empregando anti-AFB diluído a 1:10 a 1:10<sup>6</sup> em PBS e, procedendo i-ELISA com conjugado IgG anti-*mouse*-HRP diluído a 1:1000 a 1:10000, em triplicata. A seguir, procedeu-se ic-ELISA com a concentração escolhida para confirmação da seleção.

### **2.3. Solução de bloqueio**

Solução de 0,1% de ovalbumina, 0,1 % de albumina bovina e 1% leite desnatado em PBS foram testados para proceder ic-ELISA para a detecção de DON e ZEA.

### **2.4. Substrato TMB e definição de tempo de reação**

Uma alíquota de 100 µL da solução de TMB (10 mg de TMB em 1 mL de dimetilsulfóxido - DMSO) foi adicionada em 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5,0 e, no momento do uso, adicionada de 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 % e homogeneizada (manual e lenta).

O ic-ELISA foi realizado seguindo o protocolo descrito por Kawamura *et al.* (1988) com adaptações. As microplacas foram sensibilizadas com 100 µL de AFB<sub>1</sub>-BSA (250 ng/mL, Tampão PBS 0,015M pH 7,3) e incubadas (4° C / 24 h). Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 200 µL solução albumina 0,1 % em PBS e incubadas (25° C / 1 h). Após 4 lavagens com PBST, adicionou 50 µL de padrões AFB<sub>1</sub> ou amostra diluída, seguida de 50 µL AcM anti-AFB<sub>1</sub> produzido em cultivo em H-SFM (1:10000 em PBS), sendo incubado a 25° C por 1 h. A placa foi lavada 3 vezes com PBST, adicionada de 100 µL de conjugado IgG anti-*mouse*-HRP (1:

$2 \times 10^3$  em PBST) e incubada a 25° C por 1 h. Após 3 lavagens, 2 vezes com PBST, 100  $\mu$ L da solução de substrato cromógeno TMB foi adicionado. Após 15 min a 25° C, a reação enzimática foi paralisada com 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a absorvância lida em 450nm. procedendo reação em triplicata.

### **3 ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) para detecção de Desoxinivalenol**

ELISA competitivo indireto foi realizado seguindo o protocolo descrito por Kawamura (2005), Santos et al. (2011) e Souza (2013), adaptado conforme condição laboratorial. As microplacas foram sensibilizadas com 100  $\mu$ L de DON-HS-OVA (2  $\mu$ g/mL, Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1 M pH 9,6) e incubadas a 4° C por 24 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 200  $\mu$ L solução albumina 0,1 % em PBS e incubadas por 1 h a 25° C. Após 4 lavagens com PBST, adicionou 50  $\mu$ L de padrões DON ou amostra diluída, seguida de 50  $\mu$ L AcM anti-DON produzido em cultivo com 50 e 75 % H-SFM (10,9  $\mu$ g/mL, 1:2000 em PBS), procedendo reação em triplicata, sendo incubado a 25° C por 1 h. A placa foi lavada 3 vezes com PBST, adicionada de 100  $\mu$ L de conjugado IgG anti-*mouse*-HPR (1:  $2 \times 10^3$  em PBST) e incubada a 25° C por 1 h. Após 3 lavagens 2 vezes com PBST, 100  $\mu$ L da solução de substrato cromógeno TMB foi adicionado. Após 15 min a 25° C, a reação enzimática foi paralisada com 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a absorvância lida em 450nm.

### **4 ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) para detecção de Zearalenona**

#### **4.1 Otimização de conjugado ZEA-OVA**

A diluição de conjugado ZEA-OVA a ser utilizado na sensibilização do imunoenensaio foi avaliada por i-ELISA (Ac diluído, 1:1 a 1:2000), testando as concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 5  $\mu$ g/mL em tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1 M pH 9,6, em duplicata, fixando as demais concentrações para solução de bloqueio 0,1% de OVA em PBS e IgG anti-*mouse*-HPR para 1:2000.

## 4.2 Otimização de anticorpo contra AFs

A diluição ótima de AcM para imunoenensaio foi determinada, empregando anti-ZEA diluído a 1:100 e 1:200 em PBS, procedendo i-ELISA, em triplicata, fixando as demais concentrações.

ELISA competitivo indireto foi realizado seguindo o protocolo descrito por Kawamura e Emoto (2006) adaptado conforme nossa condição laboratorial. As microplacas foram sensibilizadas com 100  $\mu\text{L}$  de ZEA-OVA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1 M pH 9,6) e incubadas a 4° C por 18 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 200  $\mu\text{L}$  solução albumina 0,1 % em PBS e incubadas por 1 h a 25° C. Após 4 lavagens com PBST, adicionou 50  $\mu\text{L}$  de padrões ZEA ou amostra diluída, seguida de 50  $\mu\text{L}$  AcM anti-ZEA produzido em cultivo em RPMI suplementado com SFB (10,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1:200 em PBS), procedendo reação em triplicata, sendo incubado a 25° C por 1 h. A placa foi lavada 3 vezes com PBST, adicionada de 100  $\mu\text{L}$  de conjugado IgG anti-*mouse*-HPR (1: 2x10<sup>3</sup> em PBST) e incubada a 25° C por 1 h. Após 3 lavagens, 2 vezes com PBST, 100  $\mu\text{L}$  da solução de substrato cromógeno TMB foi adicionado. Após 25 min a 25° C, a reação enzimática foi paralisada com 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a absorvância lida em 450nm.

## 5 Cálculo da concentração de toxina detectado para ic-ELISA

A média de absorvâncias do padrão e amostras foi calculada a partir de valores individuais obtidos e os resultados expressos em valor de Logit (JICA,2004):

$$\text{Logit} = \frac{\ln B/B_0}{1-B/ B_0}$$

Sendo, B: Média da Absorvância do padrão ou amostra

B<sub>0</sub>: Média da Absorvância de PBST:metanolc (9:1, v/v)

A concentração de micotoxina foi determinada pela curva padrão (0,05 a 10 ng/mL de AFB<sub>1</sub>), plotando o valor de Logit contra valor de log da concentração de micotoxina.

## **6 Efeito da interferência de matriz na análise por ic-ELISA**

### **6.1 Milho: detecção de Aflatoxina, Desoxinivalenol e Zearalenona**

O milho (75 amostras) pertencente a safra 2010/2011 e 2011/2012 da região de Ponta Grossa – PR foram triturados (30 mesh) e mantidos a -18 °C (RISSO, 2013). Em 5 g de milho triturado adicionou-se 0,5 g de NaCl e 20 mL de solução metanol:H<sub>2</sub>O (80:30, v/v), agitada (150 rpm / 30 min), filtrada (filtro de papel e microfibra de vidro) e 500 µL do filtrado seco sob fluxo de N<sub>2</sub> a 40 °C. O resíduo foi dissolvido em PBST:metanol (9:1, v/v) (Figura 30). O resíduo suspenso em 500 µL de PBST:metanol (9:1, v/v) foi diluído no fator de até 1:50 para avaliar a interferência da matriz milho.

### **6.2 Trigo e derivados de trigo: Desoxinivalenol e Zearalenona**

Amostras de trigo (125) safra 2010 e 2011 da região de Londrina e Ponta Grossa – PR (SOUZA, 2013), assim como biscoito a base de trigo adquiridos no comércio de Londrina – PR (56, sendo 12 tipo maizena, 10 maria, 19 cream cracker e 15 água & sal) foram moídos a 30 mesh e mantidos a -18°C. A interferência de matriz foi padronizada somente para análise de DON em derivados de trigo, já que o trigo em grão foi anteriormente realizado por Souza (2013).

A determinação de DON por ic-ELISA foi baseada de acordo com método descrito por Kawamura (2005), modificada por Santos *et. al.* (2011) e Souza (2013). A uma alíquota de 5 gramas de trigo ou biscoito triturado foi adicionado 40 mL de metanol:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v), homogeneizadas (150 rpm / 30 min) e centrifugada (800 xg / 5 min, 10°C). O sobrenadante foi mantido a -18°C / 18 horas e centrifugada (2250 xg / 5 min) e, 400 µL do sobrenadante foi seco a 40°C sob nitrogênio gasoso, sendo armazenada a -18°C até o momento de análise por ic-ELISA (Figura 31). O resíduo

suspensão em 400 µl de PBST:metanol (9:1, v/v), e diluído no fator de até 1:50 para avaliar a interferência da matriz.

## **7 CLAE para confirmação de ic-ELISA**

### **7.1 Extração**

As amostras de milho, trigo e derivados (trigo) foram extraídas, procedendo modificações na técnica descrita pelo manual da fabricante das colunas de imunoafinidade (VICAM, USA) (Figura 32, 33, 34 e 35).

**Aflatoxinas:** a coluna AflaTest foi padronizada para 5 g de amostra extraído com 0,5 g de NaCl e 20 mL de metanol:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v), homogeneizada (150 rpm /30 min) e filtrada (em papel, seguida de microfibras de vidro). Uma alíquota de 10 mL do filtrado foi diluída em 40 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura e novamente filtrada (microfibras de vidro). O filtrado (20 mL), correspondente a 1 g de amostra, foi introduzido na coluna de imunoafinidade, lavado com 20 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura e, a toxina eluída com 1,5 mL de metanol, seca a 40°C sob nitrogênio gasoso, mantida a -18°C até a análise.

**DON em derivados de trigo: biscoito (10 g)** foi realizada empregando 50 mL de H<sub>2</sub>O. A solução foi homogeneizada (150 rpm / 30 min), seguido pela filtração em papel e microfibras de vidro. Volume de 5 mL do filtrado (1g de amostra) foi introduzido na coluna DONTest, lavada com 10 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura. A toxina foi eluída com 2 mL de metanol, seca a 40°C sob nitrogênio gasoso e armazenada a -18°C até o momento das análises.

**DON em milho:** 5 g de amostra foi homogeneizada (150 rpm / 30 min) em 100 mL de solução de 0,1% de Polietilenoglicol (PEG8000). Após filtração (papel e microfibras de vidro), o filtrado (20 mL), correspondente a 1 g de amostra, foi introduzido na coluna, em seguida 20 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura, e 2 mL de metanol para eluição da toxina. O eluato foi seco a 40°C sob nitrogênio gasoso e armazenado a -18°C até o momento das análises.

Zearalenona: As amostras extraídas pela coluna ZearalaTest foi realizada utilizando 5 g de amostra com 0,5 g NaCl adicionada de 25 mL de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (90:10, v/v). Após agitação (150 rpm / 30 min) e filtração (filtro de papel), 10 mL do filtrado foi diluído em 40 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura. Novamente foi filtrado (microfibra de vidro) e 30 mL do filtrado de amostras de trigo e milho (1,2 g) foi passado pela coluna. Já para amostras de biscoito, 40 mL do filtrado (1,6 g) foi passado pela coluna. Em seguida, interferentes na coluna foram retiradas com 30 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura. A toxina foi eluída com 2 mL de metanol, seca a 40°C sob nitrogênio gasoso e armazenada a -18°C até o momento da análise.

## 7.2 Procedimento

A análise de micotoxinas por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) de sistema isocrático de fase reversa foi constituída por controlador CBM-20A/SCL-10AVp com bomba LC-20AD/LC-10AT, detector de arranjo de fotodiodo (SPD-M20A) e fluorescência (RF-10AXL), forno (CTO-20AC/CTO-10AS) e desgaseificador (DGU-20A5) (Shimadzu, Japão), equipado com coluna LUNA C-18 (250x4,6 mm, 5 $\mu$ , 100 Å) (Phenomenex, USA) e coluna de guarda (Security Guard, Phenomenex, USA).

A detecção de aflatoxina total (B1, B2, G1 e G2) foi realizada com pré-derivatização com TFA, em que 100  $\mu$ L de TFA foi adicionado no extrato seco, incubado por 20 minutos e acrescido 900  $\mu$ L de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) (Miyamoto et al., 2008). O volume de 20  $\mu$ L foi injetado no sistema, sendo detectados nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel foi composta de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (32:68, v/v), sob vazão de 1,0 mL/min, temperatura do forno de 40 °C, e tempo de análise de 15 minutos.

A análise de desoxinivalenol por CLAE foi realizada concentrando a amostra em 10 vezes, utilizando arranjo de fotodiodo (Photodiode Array, PDA, Shimadzu, Japão) como o detector,

monitorando o comprimento de onda de 222 nm, sendo fase móvel composta de metanol:H<sub>2</sub>O (30:50, v/v), sob vazão de 1,2 mL/min, temperatura do forno de 25 °C e tempo de análise de 10 minutos.

Zearalenona foi detectado pré-concentrando amostra em 10 vezes, com injeção de 20 µL no sistema. O comprimento de onda monitorado no PDA foi de 276 nm, sendo fase móvel composta de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v), sob vazão de 1,0 mL/s, temperatura do forno de 40 °C e tempo de análise de 16 minutos.

## **8 Implementação do ic-ELISA para detecção de micotoxinas**

### **8.1 Exatidão**

A exatidão foi avaliada através da metodologia de recuperação. Três concentrações de micotoxinas (AF: 6, 20 e 50 µg/Kg; DON: 500, 1000 e 2000 µg/Kg; ZEA: 100, 300 e 500 µg/Kg em milho; 100, 200 e 400 µg/Kg em trigo e 50, 100 e 200 µg/Kg em biscoito) foram adicionadas nas matrizes dentro da faixa linear, sendo realizadas três repetições, analisadas em triplicata (INMETRO, 2010).

### **8.2 Precisão**

A precisão foi avaliada por repetibilidade. A repetibilidade foi realizada a precisão intracorrída, avaliada através de três concentrações analisadas, em sete replicatas no mesmo dia (INMETRO, 2010).

### **8.3 Linearidade**

A linearidade foi demonstrada pela equação de regressão linear ou transformação matemática e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), utilizando pelo menos cinco pontos da curva de calibração (SOARES, 2006; INMETRO, 2010).

### **8.4 Seletividade**

A seletividade foi realizada pelo estudo da interferência da matriz, em que comparou os

resultados da solução padrão de micotoxina em metanol:PBST (1:9) e a solução do extrato da matriz.

### **8.5 Limite de detecção e quantificação**

Limite de detecção do método (LD) foi determinado pelo cálculo de três vezes o desvio padrão de *pool* de amostra com resultado de micotoxina abaixo do LQ de CLAE (branco da amostra) em 7 replicatas (INMETRO, 2010).

Limite de quantificação (LQ) foi definido, calculando a média e seis vezes o desvio padrão dos valores de absorvância do branco da amostra, obtidos em 7 replicatas (INMETRO, 2010).

### **8.6 Estabilidade**

A estabilidade de placas sensibilizadas e bloqueadas foi avaliada num período de 4 semanas para Zearalenona e Desoxinivalenol e, 20 semanas para Aflatoxina . As análises foram realizadas uma vez por semana, avaliando os resultados das absorvâncias da curva padrão.

## **9 Análise estatística**

O resultado referente a curva padrão de AF, DON e ZEA por ic-ELISA e CLAE foi resumido por meio de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e correlação de Pearson (Excel 2011, Microsoft, USA), enquanto que para interferência de matriz foi realizada teste de Tukey (5 % de significância), utilizando-se o software Statistic 7.0 (StatSoft, Inc., USA).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **1 Padronização de ic-ELISA para análise de AFs em milho**

A concentração de AFB<sub>1</sub>-BSA ótima foi definida realizando i-ELISA, variando as diluições do AcM (1:10 a 1:1000000) (Figura 36). A curva foi plotada para obter 50 % da ligação máxima, sendo o título de anticorpo correspondente a esta porcentagem de ligação utilizada para proceder

ic-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1988). AFB<sub>1</sub>-BSA na concentração de 250 ng/mL apresentou leitura de 1.815 como maior absorvância, inferindo ser 100 % de ligação. O título de Ac correspondente a 50 % de ligação é em torno de 1:10<sup>5</sup> (Abs=0.983), podendo ser a diluição ideal para desenvolver ic-ELISA.

Kawamura *et al.* (1988) realizou com essa concentração a sensibilização do ensaio ic-ELISA para análise de AFB<sub>1</sub> em derivados de amendoim, assim como Devi *et al.* (1999) sensibilizou poços com 225 ng/mL de AFB<sub>1</sub>-BSA.

As possíveis combinações das diluições de AcM e IgG anti-*mouse*-HPR foram 1:100 e 1:10000; 1:200 e 1:7000; 1: 1:10<sup>5</sup> e 1:2000, respectivamente (Figura 37). As combinações mostraram absorvância de 0,911 a 1,184, sendo escolhida a combinação do título de AcM de 1:10<sup>5</sup> com IgG anti-*mouse*-HPR diluído a 1:2000 por almejar realizar ic-ELISA de AF simultaneamente com DON e ZEA.

A solução de bloqueio de 0,1 % de ovalbumina e 0,1 % de albumina bovina apresentaram melhores respostas na curva de ic-ELISA para análise de AF que a solução de 1% leite desnatado em PBS (Figura 38). Como a análise de AF foi realizada juntamente com DON e ZEA, a solução de 0,1 % de albumina bovina foi escolhida para prosseguir o imunoensaio.

Posteriormente, procedeu-se ic-ELISA com as concentrações escolhidas para a confirmação da seleção (Figura 39). Os resultados indicaram que experimento empregando 250 ng/mL AFB<sub>1</sub>-BSA, 1:10<sup>4</sup> (0,094 µg/mL) para Ac anti-AF (1:2000 de IgG anti-*mouse*-HPR e 0,1 % de albumina bovina como solução bloqueadora) sendo adequados para prosseguir com a padronização. A curva apresentou coeficiente de determinação de 0,996 ( $y=-2,188x + 0,1692$ ) e correlação de Pearson de -0,93, uma vez que é uma análise inversa e aumenta absorvância com a diminuição da concentração de toxina. A repetibilidade apresentou coeficiente de variação de 8, 15 e 7 % para concentrações 0,05; 0,5 e 5

ng/mL, respectivamente.

As amostras de milho aplicadas no estudo da interferência de matriz foram submetidas a diluições (1:2 a 1:50) em solução PBST:metanol (9:1, v/v) (Figura 40). A diluição 1:2 apresentou interferência de matriz de 29,2 % e a diluição 1:40 exibiu a menor interferência (4,8 %). A diluição 1:5 foi empregada no imunoenensaio visto que não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) das maiores diluições. O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) em milho foi 2 e 4,6  $\mu\text{g/Kg}$ , respectivamente, com recuperação média de 113, 106 e 104 % nas concentrações de 6, 20 e 50  $\mu\text{g/Kg}$ , com coeficiente de variação de 6 a 20 % (Tabela 9).

As placas sensibilizadas e bloqueadas permaneceram estáveis para uso por 15 semanas quando preparados AcM e padrões no dia de uso (Figura 41). A partir da 16ª semana ocorre o aumento na leitura dos padrões, não sendo mais linear a reta da curva. O uso de reagentes previamente preparados (AcM e padrões) demonstrou estabilidade até a 3ª semana, recomendando o preparo destes sempre que proceder análise.

## **2 Otimização de ic-ELISA para análise de Desoxinivalenol em biscoito e milho**

O ic-ELISA para detecção de DON está sendo otimizado ao longo dos anos no laboratório (Tabela 10). DON-HG-OVA (Desoxinivalenol-Hemiglutarato-Ovoalbumina) e DON-HS-OVA (Desoxinivalenol-Hemissuccinato-Ovoalbumina) foram cedidos pelo Dr. Osamu Kawamura. Kagawa University, Japão, sendo que ambos atuam como conjugado para sensibilização.

Atualmente, o uso de solução de 1 % de leite desnatado como diluente de anticorpo na etapa de competição e anticorpo secundário (IgG anti-*mouse*-HPR) foi alterado devido ao planejamento de utilizar as mesmas soluções de diluição para os três ic-ELISA (AF, DON e ZEA). A substituição dessa

solução, assim como mudança de temperatura, tempo e concentração não influenciaram na elaboração de imunoensaio confiável.

O AcM empregado foi produzido pela Dra. Joice S. Santos (2009) e dialisado pelo Me. Thiago M. Souza (2013). Anteriormente, a concentração proteica foi determinada em 19,19  $\mu\text{g/mL}$  (Souza, 2013) e agora na mesma diluição (1:2000), a concentração foi e 10,9  $\mu\text{g/mL}$ . Uma hipótese para redução proteica sem perda na eficiência de ligação/competição do ensaio, seria devido a desnaturação de outras proteínas presentes na solução do AcM visto que este é oriundo do cultivo em 50 a 25 % de meio RPMI suplementado com SFB, visualizando a pureza por eletroferese SDS-PAGE (Figura 42)

Os extratos de amostras-controle negativas para DON da matriz de biscoito foram submetidos a diluições (Puro a 1:50) para estudar o efeito da matriz na análise por ic-ELISA (Figura 43). A Figura evidenciou o baixo efeito das diferentes diluições de extrato no imunoensaio ( $p>0,05$ ), podendo ser utilizado sem diluição. Enquanto que para matriz milho, a diluição 1:2 apresentou 11 % de interferência, e as demais (1:5 a 1:50) variaram de 4 a 6 % de interferência. Portanto, para análise de DON em biscoito as amostras só foram ressuspensas em PBST:metanol (9:1, v/v), e para milho as amostras foram aplicadas na placa de imunoensaio na diluição de pelo menos 1:5.

A exatidão do ic-ELISA para análise de DON foi avaliada perante a taxa de recuperação de amostras de biscoito e milho contaminados artificialmente em três níveis, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g/Kg}$  para biscoito e milho (Tabela 11). A recuperação das amostras contaminadas, considerando o efeito de interferência da matriz, variou de 102 a 106 % para milho (CV médio de 9 %), e 95 a 105 % para biscoito (CV médio de 6 %).

A repetibilidade apresentou coeficiente de variação de 8, 2 e 4 % para concentrações 50; 250 e 2000  $\text{ng/mL}$ , respectivamente.

A Figura 44 apresenta linearidade na curva padrão confeccionada utilizando padrão de DON nas concentrações 25 a 2000 ng/mL, exibindo coeficiente de determinação de 0.995 e correlação de Pearson de -0.94. O ensaio apresentou LD e LQ para biscoito de 159,3 e 370  $\mu\text{g/Kg}$ , respectivamente; e LD e LQ para milho de 302,8 e 589,3  $\mu\text{g/Kg}$ , respectivamente.

As placas sensibilizadas e bloqueadas e os reagentes podem ser utilizados por 3 semanas, recomendando não utilizar aquelas armazenadas por período superior (Figura 45). Na curva da 4ª semana, o ponto de concentração menor (25 ng/mL) apresenta percentual de ligação de 102 %, indicando o início da degradação de reagente.

### **3 Padronização de ic-ELISA para análise de Zearalenona em trigo, biscoito e milho**

A concentração de ZEA-OVA ótima foi definida realizando i-ELISA, no qual testou 5 concentrações (0,25 a 5  $\mu\text{g/mL}$ ) variando as diluições do AcM (1:10 a 1:1000000) (Figura 46). A curva foi plotada para obter 50 % da ligação máxima, sendo a concentração de ZEA-OVA (2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e título de anticorpo (1:100 ou 1:200) correspondente a esta porcentagem de ligação utilizada para proceder ic-ELISA. Os i-ELISA realizados para testar os títulos de AcM 1:100 e 1:200 apresentaram densidade óptica semelhante, 0,959 e 0,930 ( $p > 0,005$ ), respectivamente, assim, foi escolhido diluição de 1:200 de AcM para prosseguir o imunoensaio.

A solução 0,1% de OVA em PBS apresenta interferência no imunoensaio (média de  $A = 0,147$  nm) em poços sem conjugado sensibilizado, necessitando procurar outra solução de bloqueio. Diferentes porcentagens de leite desnatado (0,1; 0,5 e 1 %) e 0,1 % de BSA em PBS foram testados a fim de atingir a função da etapa de bloqueio (Figura 47).

O teste de agentes de bloqueio demonstrou que a solução de bloqueio de 0,1 % BSA apresentou leitura maior em relação às outras soluções, além de apresentar baixa leitura em poços não

sensibilizados, com média de  $A=0,070$ . Incubação a 25 e 37 °C na etapa de bloqueio semelhante, definindo a temperatura de incubação a 25 °C por 1 h.

Solução diluente de Ac (AcM e IgG anti-*mouse*-HPR) testou 0,1 % leite desnatado em PBS e PBS/PBST. 1 % de leite desnatado pode ter bloqueado AcM e assim não ligou na placa ou bloqueou de vez a superfície da placa.

Os resultados demonstraram que combinação de 2,5 µg/mL ZEA-OVA, 1:200 (10,3 µg/mL) para Ac anti-ZEA, 1:2000 de IgG anti-*mouse*-HPR e 0,1 % de albumina bovina como solução bloqueadora são adequados para prosseguir o imunoensaio (ic-ELISA). A curva padrão apresentou coeficiente de determinação de 0,991 ( $y=-3,2518x + 3,9441$ ) (Figura 48) e correlação de Pearson de -0,94, uma vez que é uma análise inversa, aumenta absorvância com a diminuição da concentração de toxina. A repetibilidade apresentou coeficiente de variação de 12, 10 e 3 % para concentrações 2,5; 5 e 10 ng/mL, respectivamente.

As amostras de milho, trigo e derivado (biscoito) foram submetidos ao estudo da interferência de matriz, usando diluições (1:2 a 1:50) em solução PBST:metanol (9:1, v/v) (Figura 49). Para milho, a diluição 1:2 difere significativamente ( $p<0,05$ ) das demais diluições (24,6 %), enquanto que a 1:5 é igual estatisticamente ( $p>0,05$ ). Assim, a diluição 1:5 foi utilizada no imunoensaio.

Em trigo, a diluição Puro e 1:5 apresentaram interferência de matriz de 22,5 e 12,8 %, respectivamente. As demais diluições exibiram interferência entre 8,7 a 3,5 %, não tendo diferença significativa entre eles ( $p>0,05$ ), sendo a diluição 1:10 empregada no imunoensaio. Em relação a matriz biscoito, a diluição 1:5 demonstrou ser adequada visto que a porcentagem de interferência em relação a 1:10 é menor e não apresenta diferença significativa ( $p>0,05$ ) com as diluições maiores (1:20, 1:30 e 1:50).

Para cada matriz foi calculado o LD e LQ, sendo para milho mensurado em LD de 51,7 e LQ de 93,2  $\mu\text{g/Kg}$ ; trigo apresentou LD de 33,5 e LQ de 87  $\mu\text{g/Kg}$ ; e biscoito LD de 9,7 e LQ de 23,7  $\mu\text{g/Kg}$ . A recuperação em três níveis de contaminação apresentou-se variando de 98 a 108 % (CV de 3 a 9%) em milho, 102 a 112 % em trigo (CV de 2 a 8%) e, 96 a 105 % em biscoito (CV de 4 a 9%) (Tabela 12) .

As placas sensibilizadas e bloqueadas, assim como os reagentes (padrão e AcM diluído) apresentaram estabilidade de uso por até 2 semanas (Figura 50). Logo, as placas podem ser armazenadas em uma fase adiantada do protocolo do imunoenensaio sem perdas na reação, agilizando a análise. Para prolongar o uso das placas e reagentes prontos, estudo da ação de conservantes deveria ser realizado.

#### **4 Relação entre ic-ELISA e CLAE**

Os ic-ELISA otimizados foram testados perante amostras de milho, trigo e derivado (biscoito), sendo comparados com resultados obtidos por CLAE.

A comparação de detecção de AFs por ic-ELISA e CLAE em 75 amostras de milho (Tabela 13), observou que 8 amostras foram positivas nos dois métodos com a razão ELISA/CLAE variando de 0,8 a 1,2. Amostras positivas (4) em CLAE mas não em ic-ELISA podem ser explicadas pelo limite de detecção (2,0 $\mu\text{g/Kg}$ ) e quantificação (4,6  $\mu\text{g/Kg}$ ) do imunoenensaio.

O ic-ELISA demonstrou ser eficiente na triagem de AFs em milho, sendo uma das opções de análise rápida e específica.

A comparativa entre ic-ELISA e CLAE para análise de DON em matrizes de milho (Tabela 14) e biscoito (Tabela 15) mostrou-se satisfatório, posto que ic-ELISA é um método de triagem, e os

resultados positivos por CLAE em milho (33,5 – 373,9  $\mu\text{g/Kg}$ ) estão abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira e europeia, 3000 e 1750  $\mu\text{g/Kg}$ , respectivamente.

Assim como em biscoito, DON não foi quantificado ou detectado por ic-ELISA em amostras que estão abaixo do limite máximo da legislação (750  $\mu\text{g/Kg}$  no Brasil e 500  $\mu\text{g/Kg}$  na União Europeia). O coeficiente de correlação entre os dois métodos foi calculado em 0,72 (Figura 51) e razão (ELISA/CLAE) demonstrou variação de 0,4 a 15,8.

Em alguns cromatogramas de DON foi observado outro composto com o mesmo espectro de absorção, inferindo ser metabólito de DON, o que poderia explicar alta variação na razão ELISA/CLAE. Necessita-se adquirir padrão de metabólitos de DON para certificar a hipótese. Ic-ELISA para análise de DON em milho e biscoito demonstrou ser uma escolha para triagem, reduzindo análise por métodos analítico químico.

A confirmação da detecção de ZEA em milho, trigo e biscoito por CLAE apresentou baixa recuperação em trigo e derivados (média de 74% para trigo e 69 % para biscoito), devendo testar mais métodos de extração e de limpeza.

A comparação entre o imunoenensaio e CLAE em milho para detecção de ZEA (Tabela 16, Figura 52) apresentou coeficiente de correlação de 0,77. Considerando a legislação brasileira (400  $\mu\text{g/Kg}$ ), das 36 amostras quantificadas para ZEA, 16 exibiram valores acima do limite máximo estabelecido por ic-ELISA e CLAE, diferindo em 2 (detecção de 278,8 e 388,5  $\mu\text{g/Kg}$  por ic-ELISA, e 588,4 e 430,3  $\mu\text{g/Kg}$  por CLAE).

O estudo comparativo foi realizado em 125 amostras de trigo (Tabela 17), resultando em cinco amostras quantificadas pelos dois métodos com razão ELISA/CLAE de 0,8 a 4,2. Apenas uma amostra exibiu acima do limite de tolerância da legislação (acima de 200  $\mu\text{g/Kg}$  para Brasil) ic-ELISA, mostrando que o uso de ic-ELISA como triagem de ZEA em amostras de trigo é eficaz.

Em biscoito, das 9 amostras quantificadas pelos dois métodos (Tabela 18), por ic-ELISA 6 estariam acima do limite máximo da legislação europeia, e nenhum perante legislação brasileira. Saliendo que a recuperação por CLAE de amostras de biscoito foi 69 % (média de três níveis de contaminação), novos testes de extração e limpezas devem ser realizadas para avaliar melhor a correlação entre os métodos.

## **CONCLUSÃO**

Os imunoenaios otimizados demonstraram ser uma opção de triagem de matrizes alimentares e produtos industrializados, como análise de AF, DON e ZEA em milho; DON e ZEA em biscoito e ZEA em trigo. O uso de AcM nos ensaios demonstrou ser bioferramenta que proporciona ensaios com exatidão e precisão.

Ressalta-se que facilidade e uso de menos solvente orgânico dos imunoenaios em relação métodos químicos são atrativos para o uso como triagem, além de maior número de amostras serem analisadas, já que em uma microplaca pode-se realizar análise de 15 a 24 amostras em triplicata.

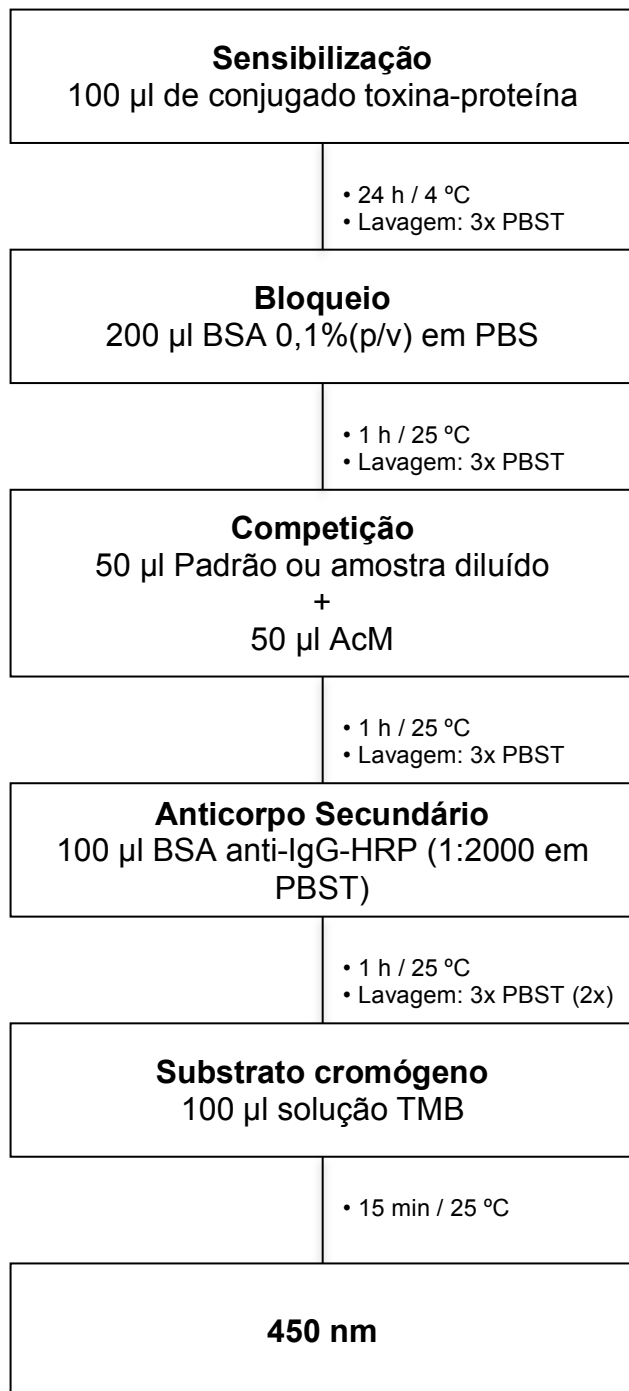


Figura 29 -Esquema geral de ic-ELISA

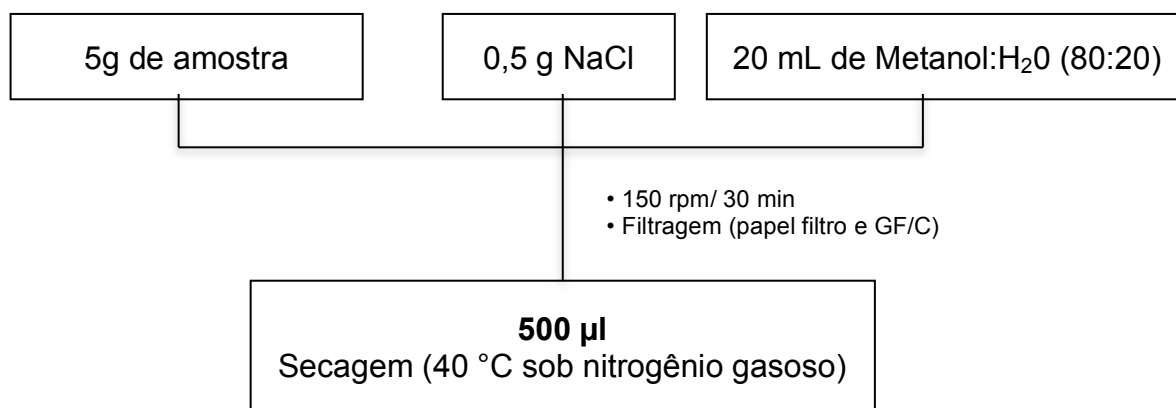


Figura 30 - Extração de milho para ic-ELISA

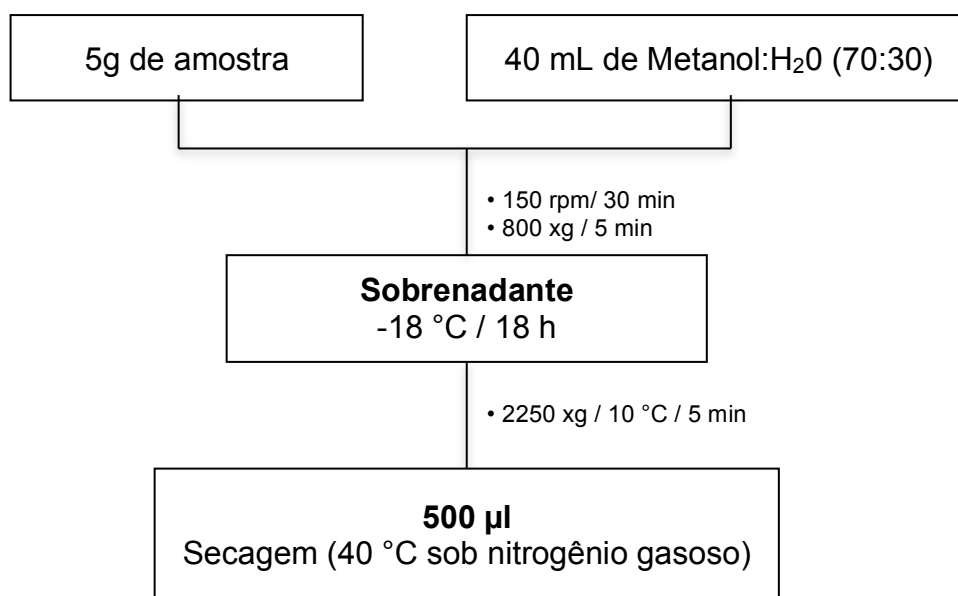


Figura 31 - Extração de trigo e biscoito para ic-ELISA

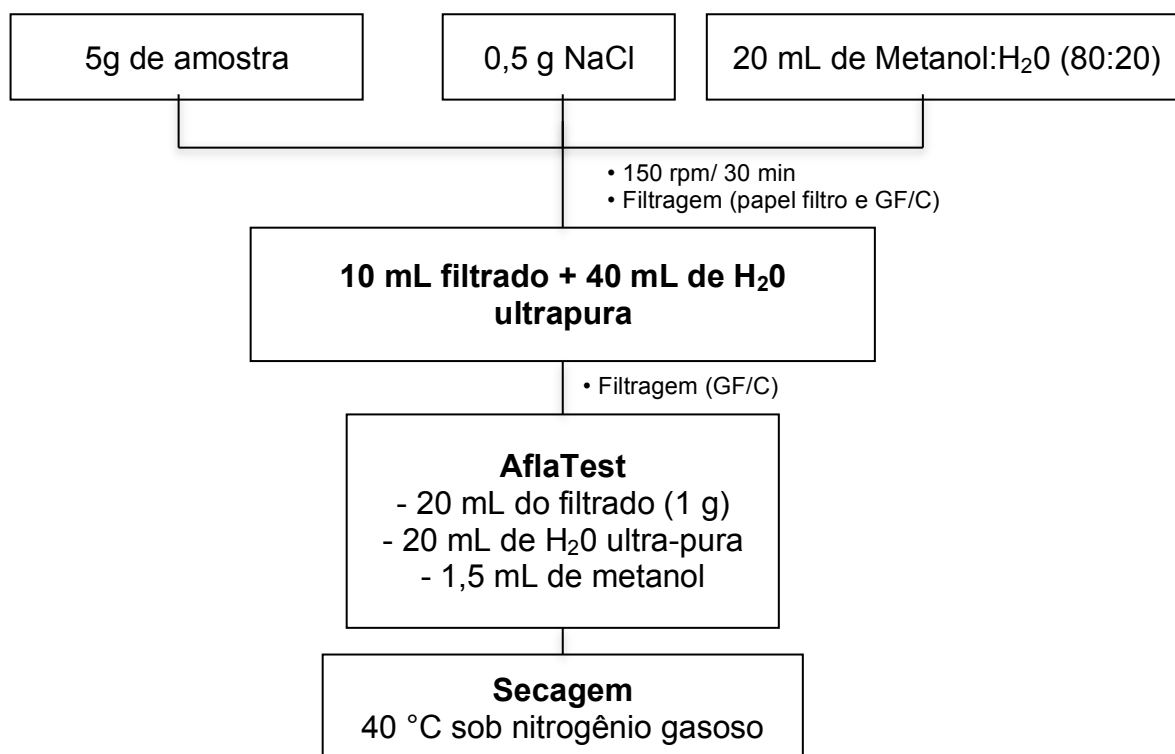


Figura 32 - Extração de matriz para análise de Aflatoxina por CLAE

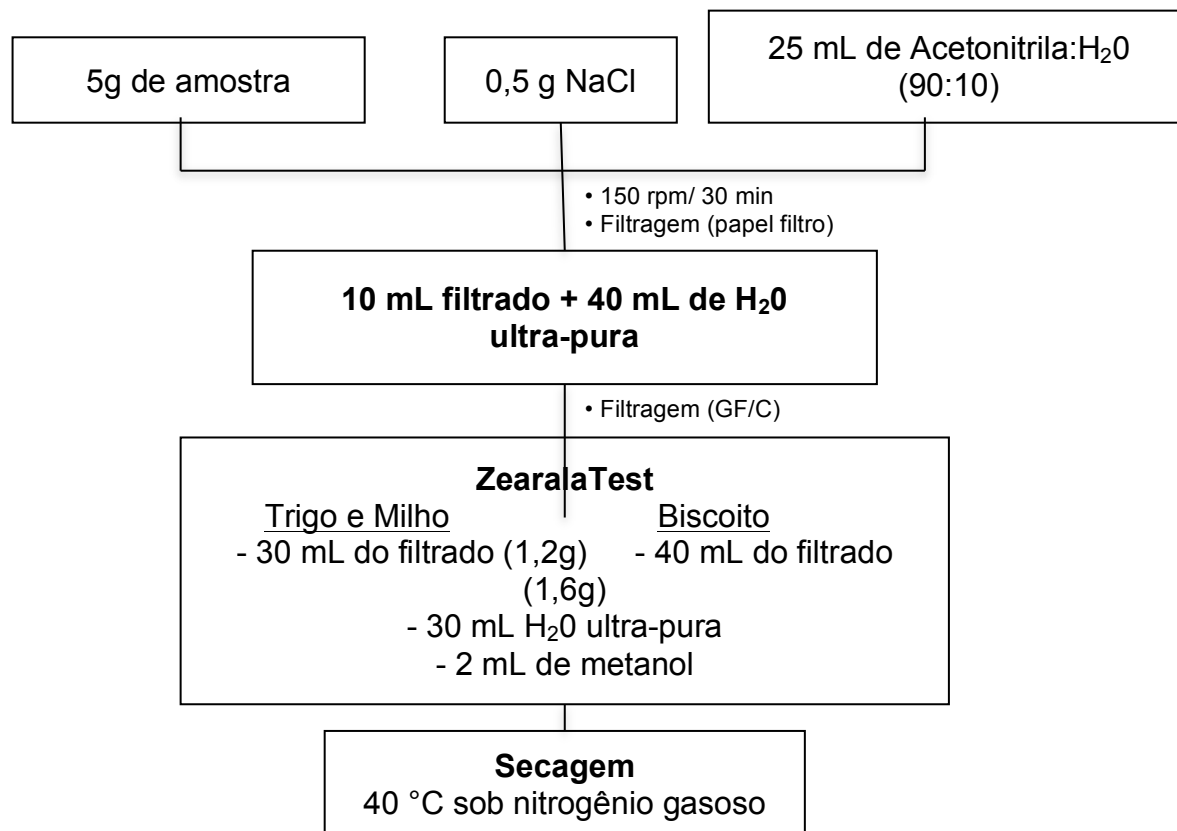


Figura 33 - Extração de matriz para análise de Zearalenona por CLAE

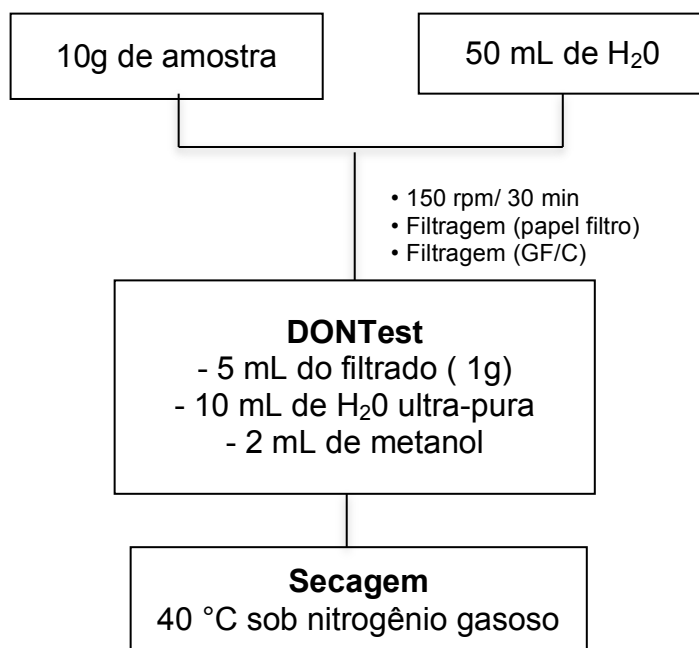


Figura 34 - Extração de matriz para análise de Desoxinivalenol por CLAE em biscoito

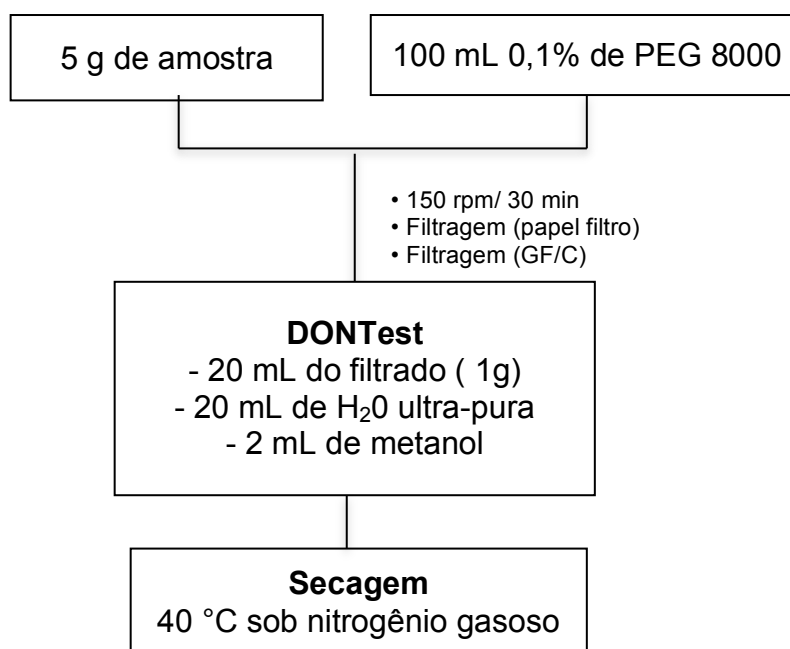


Figura 35 - Extração de matriz para análise de Desoxinivalenol por CLAE em milho

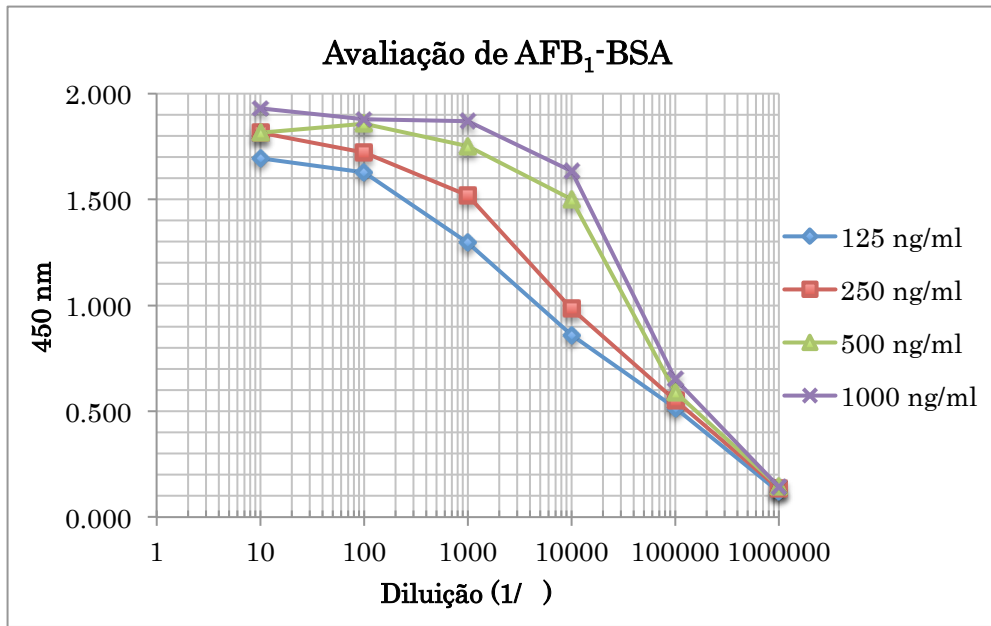


Figura 36 – Determinação da concentração ótima de AFB<sub>1</sub>-BSA empregando i-ELISA. Análise de conjugado AFB<sub>1</sub>-BSA (125 a 1000 ng/mL) em tampão PBS 0,015 M pH 7,3 empregando AcM anti-AF.

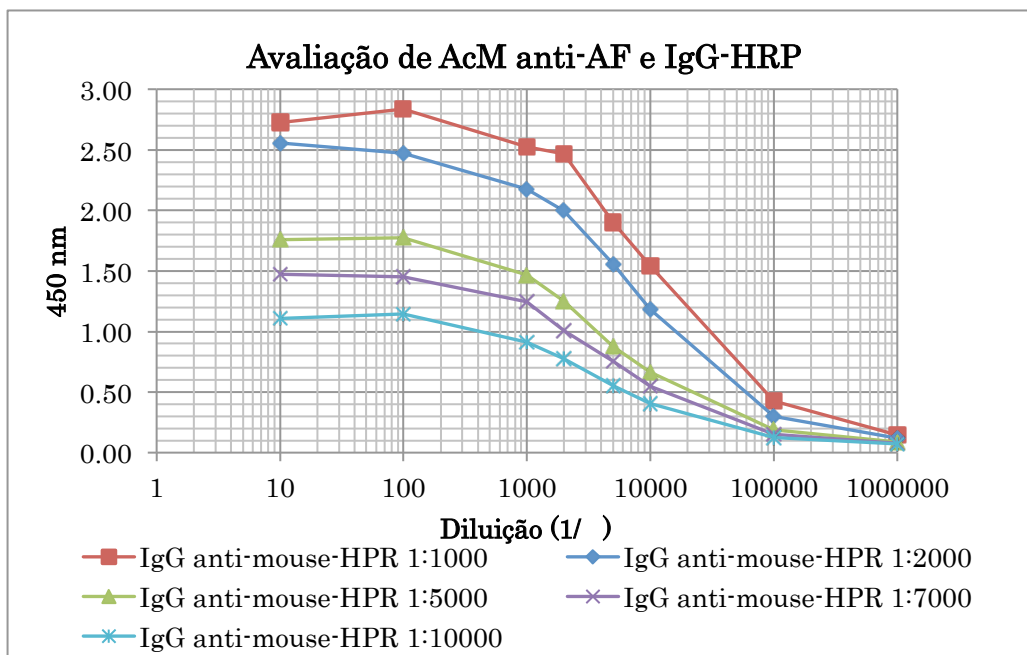


Figura 37 - Determinação da diluição ótima de AcM e IgG anti-mouse-HRP empregando i-ELISA. Análise de título de AcM a 1:10 a 1:10<sup>6</sup> em PBS e IgG anti-mouse-HRP a 1:1000 a 1:10<sup>4</sup> em PBST.

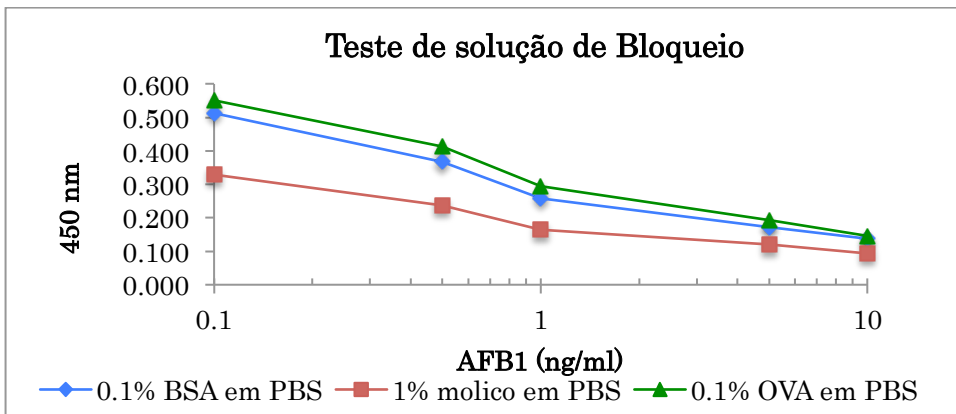


Figura 38 – Avaliação de soluções de bloqueio em ic-ELISA para análise de AF.

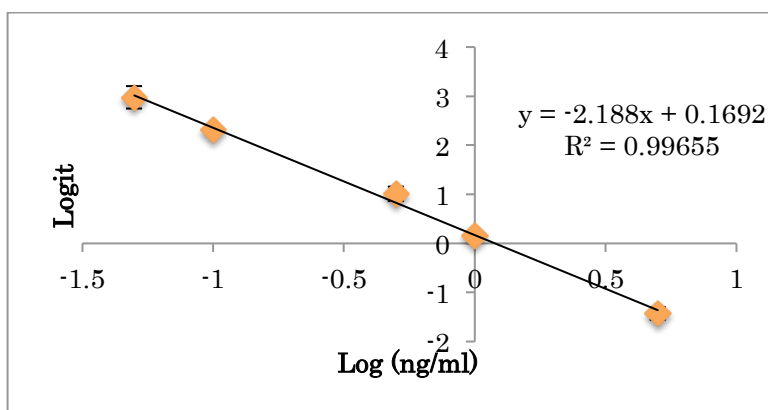


Figura 39 – ic-ELISA para análise de AF com as soluções seleccionadas. A curva padrão foi confeccionada utilizando concentração de AFB<sub>1</sub> a 0 a 5 ng/mL em PBST:metanol (9:1, v/v).

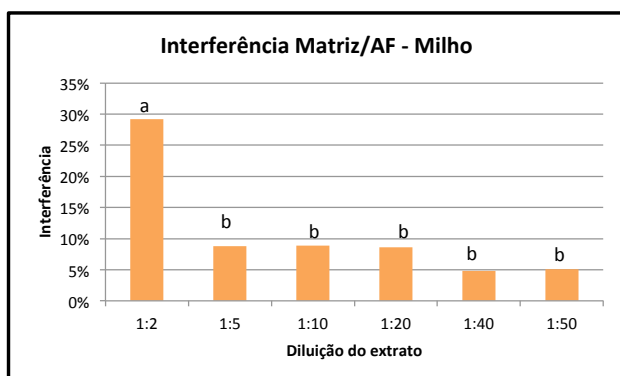


Figura 40 - Diluição de matriz milho visando redução da interferência na determinação de AFs por ic-ELISA.

Tabela 9 - Recuperação de AFs ( $AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2$ ) em matrizes alimentares contaminados artificialmente (n=3).

Toxina* ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	ic-ELISA		
	Recuperado	Recuperação (%)	CV (%)
6	$6.8 \pm 1.4$	113	20
20	$21.1 \pm 1.8$	106	9
50	$52.0 \pm 3.4$	104	6

\* Soma de  $AFB_1$ ,  $AFB_2$ ,  $AFG_1$  e  $AFG_2$

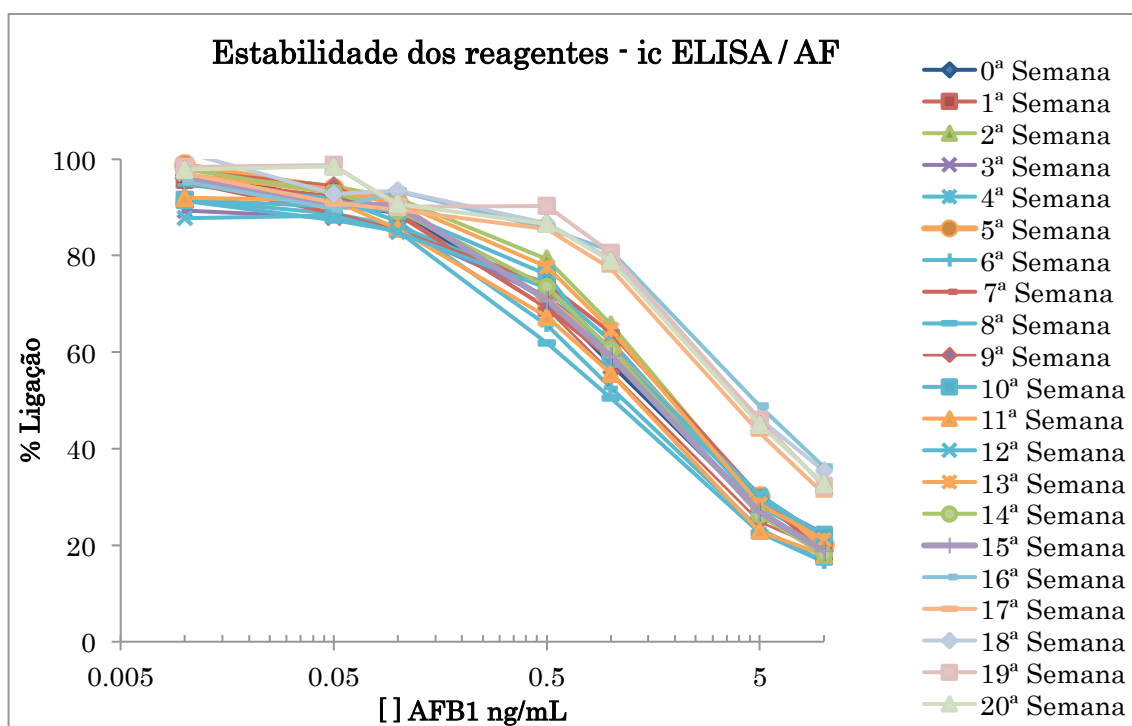


Figura 42 - Teste de estabilidade de placas sensibilizadas e bloqueadas, e reagentes armazenados a 4 °C durante 4 semanas.

Tabela 10 – Otimização de ic-ELISA para detecção de DON em trigo

ic-ELISA	Santos et al., 2011	Souza, 2013	Atual
<b>Sensibilização</b>	DON-HG-OVA 2 µg/ml		DON-HS-OVA 2 µg/ml
<b>Incubação</b>	16 h 4°C		
<b>Bloqueio</b>	0,1% OVA em PBS	1% leite desnatado em PBS	0,1% BSA em PBS
<b>Incubação</b>	1h a 37°C		1h a 25°C
<b>Competição</b>	AcM 1:200 (1,2 mg/ml) em PBST (100 % H-SFM)	AcM 1:2000 (19,19 µg/ml) em 1% leite desnatado/PBS	AcM 1:2000 (10,9 µg/ml) em PBS
<b>Incubação</b>	1h a 37°C		1h a 25°C
<b>IgG-HRP</b>	1:2000 em PBST	1:1000 em 1% leite desnatado/PBS	1:2000 em PBST
<b>Incubação</b>	1h a 25°C		
<b>Substrato</b>	20 min	20 min	15 min

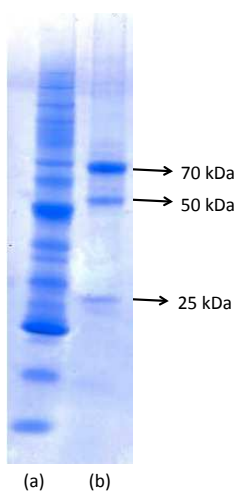
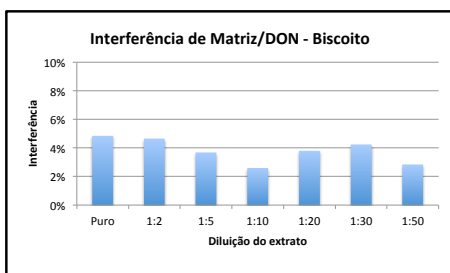
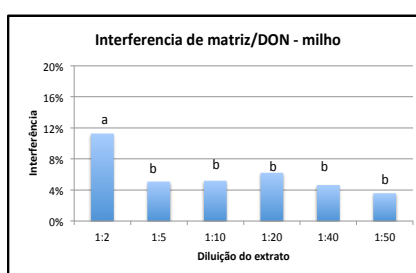


Figura 42 – Eletroforese SDS-PAGE de anticorpo produzido em meio 25 a 50 % de RPMI + 10 % SFB linhagem DON.3 dialisado. (a) marcador de proteína (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen, USA); (b) AcM dialisado. Fonte: Thiago M. Souza



(a)



(b)

Figura 43 - Diluição de matriz visando redução da interferência na determinação de DON por ic-ELISA, (a) matriz Biscoito, (b) matriz Milho.

Tabela 11 - Recuperação de DON em matrizes alimentares contaminadas artificialmente (n=3).

Matriz	Toxina ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	ic-ELISA		
		Recuperado	Recuperação (%)	CV (%)
Milho	500	$511.2 \pm 53.7$	102	11
	1000	$1062.1 \pm 77.7$	106	7
	2000	$2125.9 \pm 174.7$	106	8
Biscoito*	500	$492.3 \pm 38.7$	98	8
	1000	$953.7 \pm 28.2$	95	3
	2000	$2121.9 \pm 143.3$	106	7

\* Biscoito tipo Maizena, Maria, Cream cracker, Agua sal

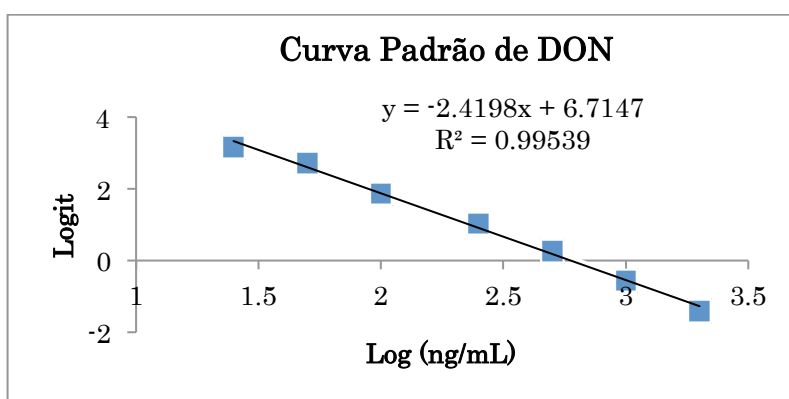


Figura 44 – ic-ELISA para análise de DON com as soluções selecionadas. A curva padrão foi confeccionada utilizando concentração de DON a 0 a 2000 ng/mL em PBST:metanol (9:1, v/v).

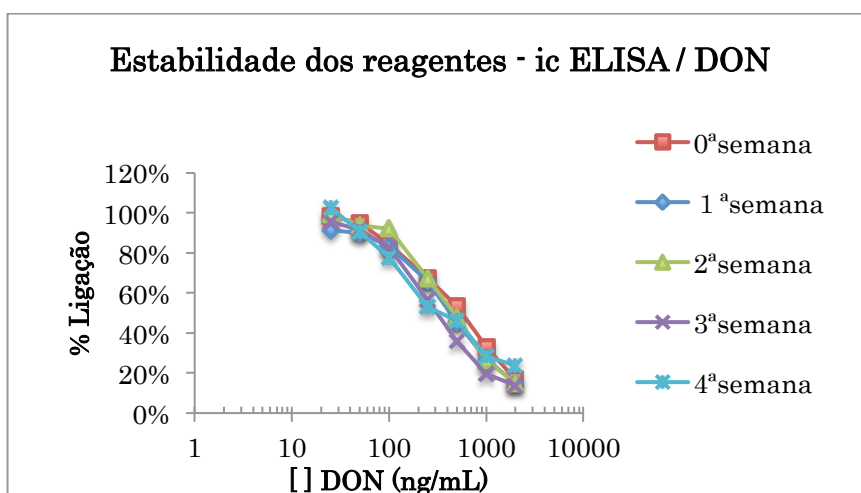


Figura 45 - Teste de estabilidade de placas sensibilizadas e bloqueadas, e reagentes armazenados a 4 °C durante 4 semanas.

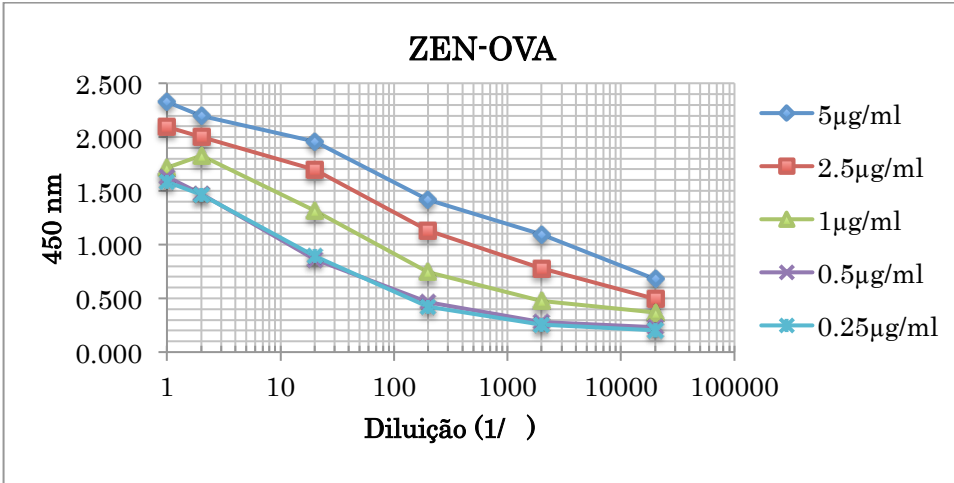


Figura 46 - Determinação da concentração ótima de ZEA-OVA empregando i-ELISA.

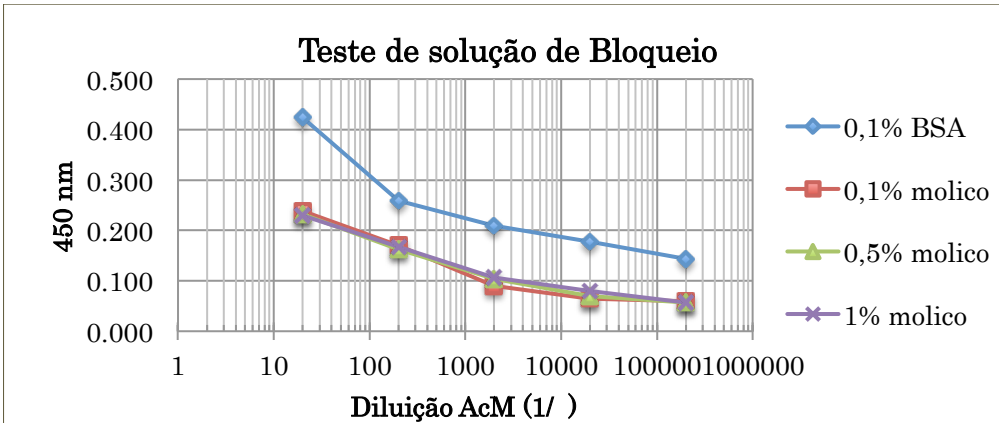


Figura 47 – Avaliação de soluções de bloqueio em ic-ELISA para análise de ZEA.

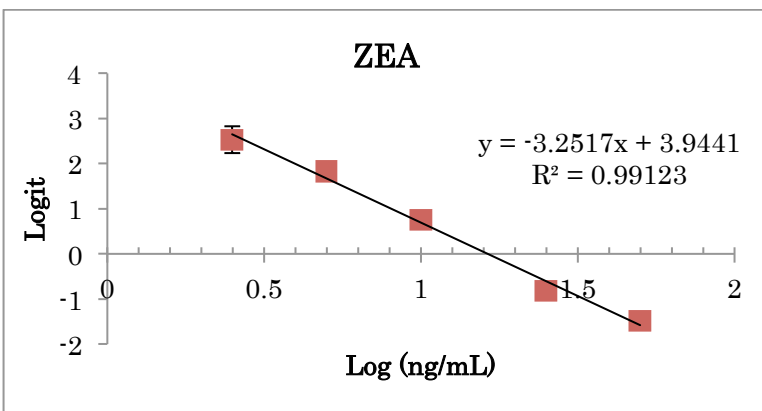


Figura 48 – ic-ELISA para análise de ZEA com as soluções selecionadas. A curva padrão foi confeccionada utilizando concentração de ZEA a 0 a 50 ng/mL em PBST:metanol (9:1, v/v).

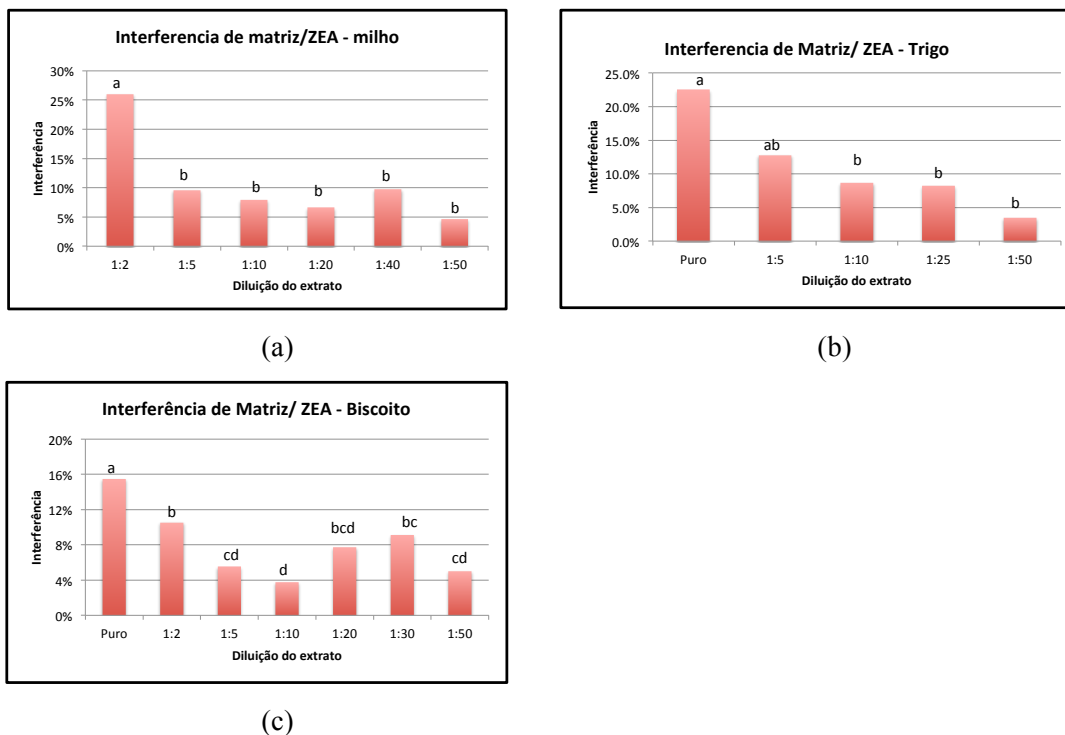


Figura 49 - Diluição de matriz visando redução da interferência na determinação de ZEA por ic-ELISA, (a) matriz Milho, (b) matriz Trigo e (c) matriz Biscoito.

Tabela 12 - Recuperação de ZEA em matrizes alimentares contaminadas artificialmente (n=3).

Matriz	ZEA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	ic-ELISA		
		Recuperado	Recuperação (%)	CV (%)
Milho	100	97.6 $\pm$ 3.7	98	4
	300	323.3 $\pm$ 29.9	108	9
	500	507 $\pm$ 17.1	101	3
Trigo	100	102 $\pm$ 8.6	102	8
	200	195 $\pm$ 4.6	97	2
	400	449.4 $\pm$ 8.3	112	2
Biscoito**	50	51.0 $\pm$ 3.8	102	7
	100	106.4 $\pm$ 9.4	105	9
	200	192.7 $\pm$ 7.3	96	4

\*\* Biscoito tipo Maizena, Maria, Cream cracker, Agua sal (média de recuperação)

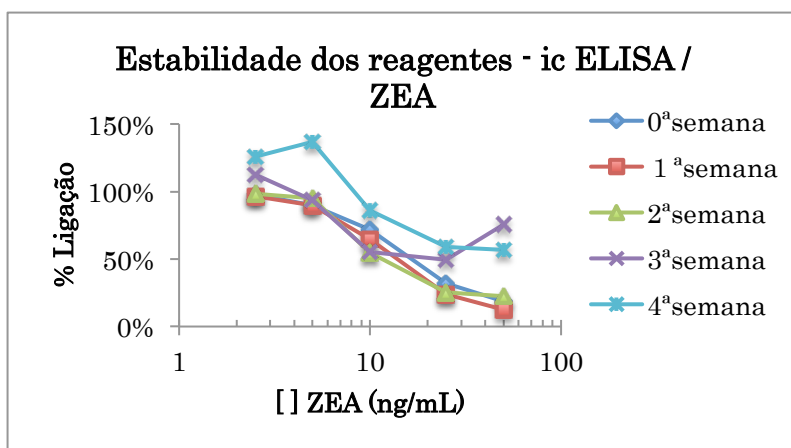


Figura 50 – Teste de estabilidade de placas sensibilizadas e bloqueadas, e reagentes armazenados a 4 °C durante 4 semanas.

Tabela 13 – Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de AFs em 75 amostras de milho.

n	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)	ELISA/CLAE
7	6.8	7.0	1.0
	7.3	7.4	1.0
	7.4	7.8	0.9
	10.5	12.5	0.8
	10.8	10.3	1.1
	11.2	9.5	1.2
	11.5	10.8	1.1
5	4.9	nd	
	5.7	nd	
	6.0	nd	
	6.8	nd	
	7.7	nd	
4	nq	2.2	
	nq	3.1	
	nq	3.8	
	nq	4.1	
1	nd	1.4	
28	nq	nd	
30	nd	nd	

ic-ELISA: não detectado (nd<2,0 µg:Kg); não quantificado (nq<4,6 µg/Kg)

CLAE: não detectado (nd<0,6 µg:Kg); não quantificado (nq<1,1 µg/Kg)

Tabela 14 – Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de DON em 75 amostras de milho.

n	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)	ELISA/CLAE
	806.6	151.8	5.3
	1327.7	233.6	5.7
5	1327.7	3226.1	0.4
	3656.9	2316.4	1.6
	4584.4	4324.5	1.1
1	1150.4	nd	
13	nq	43.3 – 373.9	
31	nd	33.5–255.2	
5	nq	nq	
7	nd	nq	
13	nd	nd	

ic-ELISA: não detectado (nd<302.8 µg:Kg); não quantificado (nq<589.3 µg/Kg)

CLAE: não detectado (nd<14.9 µg:Kg); não quantificado (nq<30.4 µg/Kg)

Tabela 15 - Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de DON em 56 amostras de biscoito.

n	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)	ELISA/CLAE	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)	ELISA/CLAE
	434.5	273.6	1.6	619.5	80.6	7.7
	438.2	269.3	1.6	675.0	508.1	1.3
	439.1	421.6	1.0	705.0	445.2	1.6
	441.4	218.4	2.0	714.2	1993.1	0.4
	447.3	58.1	7.7	806.3	1043.0	0.8
	458.7	62.9	7.3	810.2	1872.2	0.4
	503.4	346.2	1.5	847.9	1031.1	0.8
29	522.6	53.3	9.8	855.2	909.9	0.9
	523.2	783.3	0.7	927.2	998.6	0.9
	564.6	469.0	1.2	939.7	589.5	1.6
	574.8	194.5	3.0	1042.6	1352.3	0.8
	598.5	106.8	5.6	1078.5	1290.4	0.8
	603.9	66.2	9.1	1706.9	2097.5	0.8
	607.4	107.8	5.6	2031.0	1612.3	1.3
	614.5	38.9	15.8			
17	nq	51.3 – 377.8				
10	nd	20.7 – 378.6				

ic-ELISA: não detectado (nd<159.3 µg:Kg); não quantificado (nq<370 µg/Kg)

CLAE: não detectado (nd<14.9 µg:Kg); não quantificado (nq<30.4 µg/Kg)

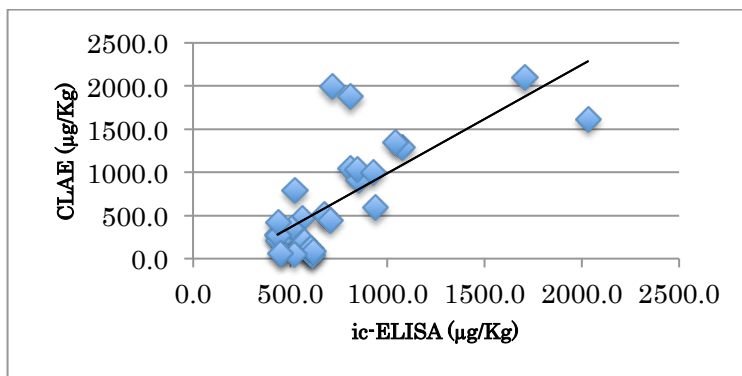


Figura 51 - Correlação de resultados obtidos por ic-ELISA e CLAE em 29 amostras de biscoito.

Tabela 16 – Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de ZEA em 75 amostras de milho.

n	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)	ELISA/CLAE	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)	ELISA/CLAE
36	115.4	93.1	1.2	387.0	358.3	1.1
	128.4	123.0	1.0	388.6	430.3	0.9
	140.3	125.9	1.1	413.8	1035.6	0.4
	141.7	101.9	1.4	467.1	441.5	1.1
	165.0	5.2	31.8	496.4	1349.8	0.4
	202.0	179.1	1.1	509.3	218.8	2.3
	202.7	136.1	1.5	513.4	317.9	1.6
	205.8	197.9	1.0	525.5	523.2	1.0
	236.5	374.8	0.6	545.5	469.4	1.2
	270.4	223.1	1.2	598.7	575.8	1.0
	272.3	274.8	1.0	837.8	636.8	1.3
	274.5	152.1	1.8	844.9	768.0	1.1
	278.8	558.4	0.5	1161.4	688.1	1.7
	296.3	263.7	1.1	1168.1	591.2	2.0
	309.8	249.0	1.2	1132.6	777.1	1.5
	315.1	291.9	1.1	1428.8	1002.7	1.4
	322.9	374.9	0.9	1458.7	839.4	1.7
	345.6	276.7	1.2	1701.2	1634.9	1.0
	7	nq	4.1 – 42.3			
17	nd	3.1 – 91.9				
4	nq	nq				
11	nd	nd				

ic-ELISA: não detectado (nd<51.7 µg/Kg); não quantificado (nq<93.2 µg/Kg)

CLAE: não detectado (nd<0.9 µg/Kg); não quantificado (nq<2.7 µg/Kg)

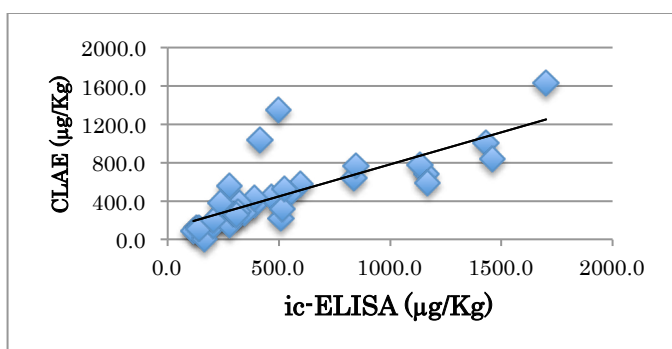


Figura 52 - Correlação de resultados obtidos por ic-ELISA e CLAE em 36 amostras de milho.

Tabela 17 - Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de ZEA em 125 amostras de trigo.

n	ic-ELISA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	CLAE ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	ELISA/CLAE
	90.7	21.4	4.2
	94.4	34.6	2.7
5	111.8	28.5	3.9
	146.7	17.2	8.5
	281.8	358.8	0.8
10	nq	3.2 – 60.3	
2	nq	nq	
7	nq	nd	
19	nd	3.9 – 20.8	
8	nd	nq	
74	nd	nd	

ic-ELISA: não detectado ( $\text{nd}<33.5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ); não quantificado ( $\text{nq}<87.0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ )

CLAE: não detectado ( $\text{nd}<0.9 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ); não quantificado ( $\text{nq}<2.7 \mu\text{g}/\text{Kg}$ )

Tabela 18 - Comparação de resultados realizados por ic-ELISA e CLAE para análise de ZEA em 56 amostras de biscoito.

n	ic-ELISA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	CLAE ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	ELISA/CLAE
9	31.3	4.7	6.6
	34.0	37.9	0.9
	35.2	2.9	12.2
	51.9	8.5	6.1
	52.7	5.4	9.7
	60.1	8.3	7.3
	60.9	3.7	16.3
	84.2	7.8	10.8
	95.0	8.7	10.9
3	nq	24.5 – 67.0	
5	nd	29.9 – 92.2	
4	nq	10.7 – 15.0	
1	nq	nq	
14	nd	nd	

ic-ELISA: não detectado ( $\text{nd}<9.7 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ); não quantificado ( $\text{nq}<23.7 \mu\text{g}/\text{Kg}$ )

CLAE: não detectado ( $\text{nd}<0.9 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ); não quantificado ( $\text{nq}<2.7 \mu\text{g}/\text{Kg}$ )

#### 4. CONCLUSÃO FINAL

A exposição a contaminação por toxinas naturais na cadeia alimentar pode ser minimizada com eficiente monitoramento. Atualmente, preconiza o uso de métodos analíticos rápidos, fácil e econômico além de sensível, específico, confiável e preciso. O método imunológico (imunoensaio) atende o propósito, sendo amplamente utilizada em várias áreas científicas.

O hibridoma para produção de anticorpo monoclonal contra microcistina resultou em 9 clones, porém não apresentaram alta afinidade a MC-LR por ic-ELISA. O protocolo de i-ELISA para detectar presença de anticorpo anti-MC-LR foi estabelecido com 1µg/mL de MC-LR-KLH; 0,1% de leite desnatado/PBS para bloqueio; AcM anti-MC-LR em PBST; anticorpo secundário em PBST (IgG anti-*mouse* conjugado com fosfatase, 1: 2000) e substrato *para*-nitro fenil fosfato - pNPP.

Os híbridos AF.2 e ZEN.2 produziram AcM de alta especificidade, aliado a baixa reatividade cruzada contra micotoxinas (DON, OTA e ZEA ou AF). O produto de hibridoma AF.2, obtido em H-SFM, consistiu de AcM de alta pureza, sendo empregados na implementação e otimização de ic-ELISA. A aplicabilidade de AcM (hibridoma AF.2, ZEN.2 e DON.3) para análise de AF, DON e ZEA em milho, trigo e derivado por ic-ELISA foi avaliada perante interferência de matriz, recuperação e comparação com valores obtidos por CLAE, demonstrando serem métodos de triagem rápida de micotoxinas na cadeia produtiva de alimentos.

## 5. REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TANAKA, T.; TOYODA, M. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in spices using multifunctional column clean-up. **Journal of Chromatography A**, v.932, p.153-157, 2001.
- ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 13, 173-183, 2002.
- AYBAY, C.; IMIR, T. Development of a rapid, single-step procedure using protein G affinity chromatography to deplete fetal calf serum of its IgG and to isolate murine IgG1 monoclonal antibodies from supernatants of hybridoma cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 233, p.77-81, 2000..
- AZEVEDO, S. M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v. 181 -182, p. 441-446, 2002.
- BAICU, S.C.; TAYLOR, M.J. Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. **Cryobiology**, v. 45 n.1, p. 33-48, 2002.
- BAIER, W.; M. LOLEIT, M.; FISCHER, B.; JUNG, G.; NEUMANN, U.; WEIB, M.; WECKESSER, J.; HOFFMANN, P.; BESSLER, W.G.; MITTENBÜHLER, K. Generation of antibodies directed against the low-immunogenic peptide-toxins microcystin-LR/RR and nodularin. **International Journal of Immunopharmacology**, v.22, p. 339-353, 2000.
- BAZIN, R.; LEMIEUX, R. Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). **Journal of Immunological Methods**, v.116, p. 245-249, 1989.
- BERG J.M., TYMOCZKO J.L., STRYER L. The molecular design of life. In: BERG J.M., TYMOCZKO J.L., STRYER L. **Biochemistry**. New York: W.H. Freeman and Co., 2002.
- BINDER, E.M.; TAN, L.M.; CHIN, L.J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.265-282, 2007.
- BIRCH, J.; RACHER, A. Review: Antibody production. **Advanced Drug Delivery**, v.58, p. 671- 685, 2006.
- BOENISCH, T. Antibodies. In: **Handbook Immunochemical Staining Methods**. DAKO Corporation, California, USA. editor: Thomas Boenisch, 3rd edition. 2001. p. 5-11.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.5, p.248-54, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, seção 1, n. 46, p.66, 9 mar 2011.
- BRAVIN, F.; DUCA, R.C.; BALAGUER, P.; DELAFORGE, M. In vitro cytochrome p450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.1824-1837, 2009.
- CALLERI, E.; MARRUBINI, G.; BRUSOTTI, G.; MASSOLINI, G.; CACCIALANZA G. Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p.396-403, 2007.
- CANDLISH, A.A.G.; SMITH, J.E.; STIMSON, W.H. Monoclonal Antibody Technology for mycotoxins. **Biotechnology Advances**, v. 7, p.401-418, 1989.
- CARMICHAEL, W.W. Toxic Microcystis and the Environment. In: WATANABE, M.; HARADA, K-I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Ed.). **Toxic Microcystis**. USA: CRC Press. 1995 p.1-11.

CARLSON, M.A; BARGERON, C.B. ; BENSON, R.C.; FRASER, A.B.; PHILLIPS, T.E.; VELKY, J.T.; GROOPMAN, J.D.; STRICKLAND, P.T.; KO, H.W. An automated, handheld biosensor for aflatoxin. **Biosensors & Bioelectronics**, 14,841–848, 2000.

CERVINO, C.; WEBER, E.; KNOPP, D.; NIESSNER, R. Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v.329, p.184–193, 2008.

CX/CF 12/6/9. JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME and CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS. Proposed draft maximum levels for deoxynivalenol (DON) in cereals and cereal-based products and associated sampling plans (at Step 3). Codex Committee on Contaminants in Foods, Sixth Session Maastricht, 2012, 42 p.

CHIAVARO, E.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BIANCARDI, A.; GAMBARELLI, E.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, v.937, p.31-40, 2001.

CHO, S.-H.; LEE, C.-H.; JANG, M.-R.; SON, Y.-W.; LEE, S.-M.; CHOI, I.-S.; KIM, S.-H.; KIM, D.-B. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry**, v.107 p. 1283–1288, 2008.

CHU, F.S.; UENO, I. Production of antibody against aflatoxin B1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.1125-1128, 1977.

COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) n°1881/2006** de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. Disponível em: <[http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2006/l\\_364/l\\_36420061220pt00050024.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2006/l_364/l_36420061220pt00050024.pdf)> Acesso em 08 ago. 2013.

COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) n°401/2006**, 2006 de 23 de Fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:PT:PDF>> Acesso em 24 jul. 2013.

COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA. **Commission Regulation (EC) No 1126/2007** of 28 September 2007, amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. 2007.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, Safra 2012/2013, décimo levantamento, julho 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2013. 29p.

COULOMBE, R.A.JR. Biological Action of Mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, no. 3, p. 880-891, 1993.

DALY, S.J.; KEATING, G.J.; DILLON, P.P.; MANNING, B.M.; O'KENNEDY, R.; LEE, H.A.; MORGAN, M.R. Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48,.5097-104, 2000.

DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 953-962, 1998.

DELMULLE, B. S., S. M. DE SAEGER, L. SIBANDA, I. BARNA-VETRO, AND C. VAN PETEGHEM. Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B1 in pig feed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 3364-3368, 2005.

DEVI, K.T.; MAYO, M.A.; REDDY, K.L.N.; DELFOSSE, P.; REDDY, G.; REDDY, S. V.; REDDY, D.V.R. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B<sub>1</sub>. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 248-288, 1999.

DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v.102. p. 132–145, 2011.

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

DORO SILVA, D.L. **Anticorpo monoclonal de alta eficiência no desenvolvimento de imunológica aplicada – análise de ocratoxina em vinho**. 2010. 124p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

EDINBORO, L. E.; KARNES, H. T. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub> in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extraction coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1083, p.127-132, 2005.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. SCIENTIFIC OPINION : Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. **EFSA Journal**, v.9, n.6, 2011, 124p.

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

FALCONER, I.R. **Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies: Cylindrospermopsins and Microcystins**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004. 279 p.

FIGUEIREDO, A.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F.J.M.; PEREIRA, M.J. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, p.151–163, 2004.

FUJII, S. **Métodos imunológicos para detecção de ocratoxina A, produção de imunorreagente e aplicação em diferentes matrizes alimentares**. 2007. 100p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

FUJII, S. **Imunoensaio na detecção de ocratoxina A e efeito de cafeína sobre microbiota fúngica**. 2002. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

FUJIKI, H., SUEOKA, E., SUGANUMA, M., Carcinogenesis of Microcystins. In: WATANABE, M.F., HARADA, K., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H. (Eds.): **Toxic Microcystis**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 203-232, 1996.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Brasília. **Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde**. 2003. 56p.

GOLDBERG, J., HUANG, H., KWON, Y., GREENGARD, P., NAIRN, A.C., KURIYAN, J., Three Dimensional Structure of the Catalytic Subunit of Proteinserine/Threonine Phosphatase-1. **Nature**, 376, 745–753, 1995.

GORYACHEVA, I.U.; SAEGER, S.; DELMULLE, B.; LOBEAU, M.; A. EREMIN, S.A.; BARNA- VETRÓ, I.; VAN PETEGHEM, C. Simultaneous non-instrumental detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using a clean-up tandem immunoassay column. **Analytica Chimica Acta**, 590, 118–124, 2007.

GROOPMAN, J.D; TRUDEL, L.J.; DONAHUE, P.R.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; WOGAN, G.N. High-affinity monoclonal antibodies for aflatoxin and their application to solid-phase immunoassays. **Biochemistry**, v.81, p.7728-7731, 1984.

HARADA, K-I.; SUZUKI, M.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W.; RINEHART, H.L, JR. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. **Toxicon**, 26,

HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 726 p., 1988.

HASHIMOTO, E. H. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; HIROOKA, E. Y. . Risco de *Microcystis* spp. tóxico no cenário de piscicultura brasileira. **Biosaúde** (Londrina), Londrina-PR, 1, 69-92, 2003.

HAYASHI, L. **Anticorpo monoclonal anti-AFB<sub>1</sub>: coluna de imunoafinidade e espectrofluorimetria para controle de qualidade de alimentos**, 2007. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

HERMANSON, G.T. **Bioconjugate Techniques**. Academic. Press, 2008 p.1195.

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, 2010. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, v. 94, p.329-412, 2010.

IARC, 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Stryrene. **International Agency for Research on Cancer** 82, 171-300, 2002.

IARC, 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances, food items and constituents. **Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**, vol.56. World Health Organization, Lyon, France, p.397-444, 1993.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE, Estatística da Produção Pecuária Março de 2011, 2011. 30 p.

ILAR - INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH Council. **Monoclonal Antibody Production** -A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies Institute for Laboratory Animal Research National Research Council. National Academy Press Washington, DC, 1999.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010. **DOQ-CGCRE-008**, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: 03 – março/2010.

ISHIKAWA, A.T. **Hibridoma OTA.1: anticorpo anti-OTA no desenvolvimento da coluna de imunoafinidade e aplicação associada à qualidade e segurança de vinho**. 2012. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

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

JECFA. Zearalenone. In Joint FAO/WHO expert committee on food additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. WHO/FAO food additives series 44. IPCS-International Programme on Chemical Safety, Geneva: WHO, 2000.

JECFA. Evaluation of certain mycotoxins in food (Fifty-sixth report of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives). **WHO Technical Report Series**, n.906, 2002.

JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY (JICA). Textbook JICA group training course on mycotoxin inspection in food. 2004.

JOULLIE, M.M.; LASSEN, K. Evolution of amide bond formation. **Arkivoc** (viii), p. 189-250, 2010.

KAMOGAE, M.; HIROOKA, E.Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum**, 22, 1189-1200, 2000.

- KAWAMURA, O.; NAGAYAMA, S.; SATO, S.; OHTANI, K.; UENO, I.; UENO, Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut products. **Mycotoxin Research**, v.4, p.75-87, 1988.
- KAWAMURA, O. Production of monoclonal antibodies against deoxynivalenol and development of a high sensitive ELISA using enzyme amplification. **Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University**, v.57, p.27-33, 2005.
- KAWAMURA, O.; EMOTO, A. Production of monoclonal antibodies against zearalenone. **Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University**, v. 58, p. 7-12, 2006.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.
- KOLOSOVA, A.Y.; SHIM, W.; YANG, Z.; EREMIN, S.A.; CHUNG, D. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.384, p.286-294, 2006.
- KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; MOLINELLI, A.; SULYOK, M.; MACDONALD, S.; CREWS, C. Mycotoxin analysis: An update. **Food Additives and Contaminants**, 25,152-163, 2008.
- KUDO, t.; MORISHITA, R.; SUZUKI, R.;TACHIBANA, T. A great improvement of fusion efficiency in mouse B cell hybridoma medium, *Git*. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.153, p.55-66, 1987.
- KUZDRALINSKI, A.; SOLARSKA, E.; MUSZYNSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **Food Control**, v. 29, p. 22-24, 2013.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.
- LEE, N.A.; WANG, S.; ALLAN, R.D.; KENNEDY, I.R. A rapid aflatoxin B<sub>1</sub> ELISA: Development and Validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2746-2755, 2004.
- LEGAZPI L., DÍAZ J., LACA A., DÍAZ M. Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: substrate and agitation effects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 122-130, 2005.
- LERNER, E.A. How to make a hybridoma. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.54, p.387-402, 1981.
- LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxins. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115-1126, 2009.
- LUUKKAINEN, R.; SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; FARDIG, M.; RINEHART, K.L.; NIEMELA, S.I. Isolation and Identification of Eight Microcystins from Thirteen *Oscillatoria agardhii* Strains and Structure of a New Microcystin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.7, p. 2204-2209, 1993.
- MAKISHIMA, F.; TERADA, S.; MIKAMI, T.; SUZUKI, E. Interleukin-6 is antiproliferative to a mouse hybridoma cell line and promotive for its antibody productivity. **Cytotechnology**, v.10, p.15-23, 1992.
- MARTIN, M. L.; MARTINS, H.M. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 79, p.315-318, 2002.
- MARUSICH, M.F.. Efficient hybridoma production using previously frozen splenocytes. **Journal Immunological Methods**, v.114, p. 155-159, 1988.
- METCALF, J S, BELL, S G, CODD, G A, Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. **Water Research** 34, 2761-2769, 2000.

- MIYAMOTO, K.; HAMADA, A.; KAWAMURA, O. Determination of aflatozins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF.2 monoclonal antibody-HPLC method. **Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kawaga University**, v.60, n. 113, p. 75-81, 2008.
- MUSCARELLA, M.; LO MAGRO, S.; PALERMO, C.; CENTONZE, D. Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, 594, 257–264, 2007.
- NAGATA, S.; SOUTOME, H.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; SEKIJIMA, M.; SUGAMATA, M.; HARADA, K-I.; SUGANUMA, M.; UENO, Y. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. **Natural Toxins**, v.3, n.2, p.78-86, 1995.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H., Liver Tumor Promotion by the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-LR. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, 118, 420-424, 1992.
- OI, V.T.; HERZENBURG, L.A. **Immunoglobulin-producing hybrid cell lines**. In B.B. Mishel and S.W. Shiigi (eds) Selected Methods in Cellular Immunology, W.F. Freeman & Co. San Francisco, p. 351-371, 1980.
- OKESON, C.D.; RILEY, M.R. Glutamine replenishment and ammonia removal in hybridoma cell cultures via immobilized glutamine synthetase. **Biochemical Engineering Journal**, v.9 n.2, p.125-133, 2001.
- ONO, E.Y.S.; KAWAMURA, O.; ONO, M.A., UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, v.12, n.1, p.5-14, 2000.
- ORSI, R.B.; OLIVEIRA, C.A.F.; DILKIN, P.; XAVIER, J.G.; DIREITO, G.M; CORRÊA, B. Effects of oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Chemico-Biological Interactions**, v.170,n.3, p.201-208, 2007.
- PESTKA, J.J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 283–298, 2007.
- PFEIFFER, E.; HILDEBRAND, A.; DAMM, G.; RAPP, A.; CRAMER, B.; HUMPF, H.U.; METZLER, M. Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.53, p.1123-1133, 2009.
- PFEIFFER, E.; HILDEBRAND, A.; MIKULA, H.; METZLER, M. Glucuronidation of zearalenone, zeranol and four metabolites in vitro: formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.54, p.1468-1476. 2010
- PITTET, A. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v.96, p.424-444, 2005
- PRIETO-SIMÓN, B.; NOGUER, T.; CAMPÀS, M. Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n.7, p.689-702, 2007.
- PYO, D.; HUANG, Y.; KIM, Y.; HANH, J.H. Ultra-sensitive analysis of microcystin LR using microchip based detection system. **Bulletin Korean Chemical Society**, v. 26, n. 6, 939-942, 2005.
- PYO, D.; CHOI, E.; CHA, G.S.; LEE, J.; JUNG, S.; KIM, M.S. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Microcystin LR. **Bulletin Korean Chemical Society**, v.24, n.1, p.126-128, 2003.
- RAN, R.; WANG, C.; HAN, Z.; WU, A.; ZHANG, D.; SHI, J. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. **Food Control**, v.34 138e148, 2013.
- RISSE, W.E. **Manejo e tratos culturais em milho: influência em nível de fumonisina, composição química e qualidade sanitária de grão**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia** 4ª ed.. Manole São Paulo. 1997.

- SAHA, D.; ACHARYA, D.; ROY, D.; SHRESTHA, D.; DHAR, T.K. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in chili samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p.343–349, 2007.
- SANTOS, J.S.; TAKABAYASHI, C.R.; ONO, E.Y.S.; ITANO, E.N.; MALLMANN, C.A.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, Y. Immunoassay based on monoclonal antibodies versus LC-MS: deoxynivalenol in wheat and flour in Southern Brazil. **Food Additives and Contaminants**, iFirst, p.1-8, 2011.
- SANTOS, J.S. **Aplicação biotecnológica: anticorpo monoclonal anti-desoxinivalenol para monitoramento e avaliação da exposição pelo consumo de trigo (*triticum aestivum* L.)**. 2009. 124p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.
- SAPSFORD, K. E.; TAITT, C. R.; FERTIG, S.; MOORE, M. H.; LASSMAN, M. E.; MARAGOS, C.M.; SHRIVER-LAKE, L. C. Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in corn and nut products using the array biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 21,2298- 2305, 2006.
- SCHNERR, H.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. A Biosensor-based Immunoassay for Rapid Screening of Deoxynivalenol Contamination in Wheat. **Food and Agricultural Immunology**, 14, 313-321, 2002.
- SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; DAHLEM, A.M.; NIEMELA, S.I. Isolation and Characterization of Hepatotoxic Microcystin Homologs from the Filamentous Freshwater Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain152. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.9, p. 2650-2657, 1990.
- SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; SUN, F.; ROUHIAINEN, L.; LUUKKAINEN, R.; RINEHART, K.L. Isolation and Characterization of a Variety of Microcystins from Seven Strains of the Cyanobacterial Genus *Anabaena*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.8, p. 2495-2500, 1992.
- SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial Toxins. In: CHORUS, I; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, WHO, 1999.
- SHENG, J-W.; HE, M.; SHI, H-C. A highly specific immunoassay for microcystin-LR detection based on a monoclonal antibody. **Analytica Chimica Acta**, v.603, p. 111–118, 2007.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p.76-85, 1985.
- SOARES, L.V. Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos. Barueri-SP: Manole, p.43- 51, 2006.
- SOUZA, T.M. **Impacto de manejo e tratos culturais na composição química, contaminação por desoxinivalenol –DON e qualidade tecnológica de trigo no Estado do Paraná-Brasil**. 2013. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.
- TAKABAYASHI, C.R. Bioferramenta analítica: produção e desenvolvimento empregando anticorpo monoclonal antiaflatoxina (hibridoma AF2 e AF4). 2009. 72p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- TAVČAR-KALCHER, G.; VRTAČ, K.; PESTEVŠEK, U.; VENGUŠT, A. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. **Food Control**, 18, 333-337, 2007.
- TERMO FISHER SCIENTIFIC. Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook. 2009.
- TINTÓ, A.; GABERNET, C.; VIVES, J.; PRATS, E.; CAIRÓ, J.J.; CORNUDELLA, L.; GÒDIA, F. The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. **Journal of Biotechnology**, v.95, p.205–214, 2002.
- TIZARD, IAN R. **Immunology : :an introduction**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1995.

VAN EGMOND, H.P.; SCHOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. Review Regulations relating to mycotoxins in food Perspectives in a global and European context. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 147-157, 2007.

XIAO, H.; CLARKE, J.; MARQUARDT, R. R; FROHLICH, A. A. Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2092-2097, 1995.

XIULAN, S.; XIAOLIAN, Z.; JIAN, T.; XIAOHONG, G.; JUN, Z.; CHU, F. S. Development of a immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B1 in foods. **Food Control**, v. 17, p. 256-262, 2006.

WATANABE, M.F.; HARADA, K-I.; MATSUURA, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, M. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, v.1, p. 161-165, 1989.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003. **Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water**. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2003.

ZECK, A.; EIKENBERG, A.; WELLER, W.G.; NIESSNER, R. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. **Analytica Chimica Acta**, v.44, 11-13, 2001a.

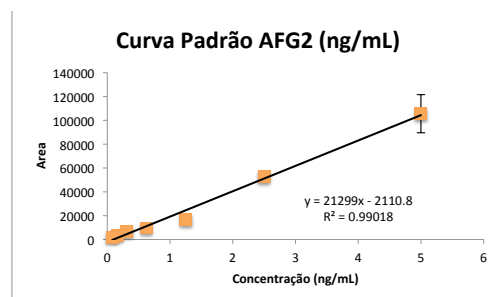
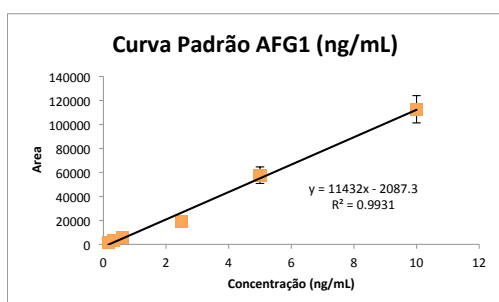
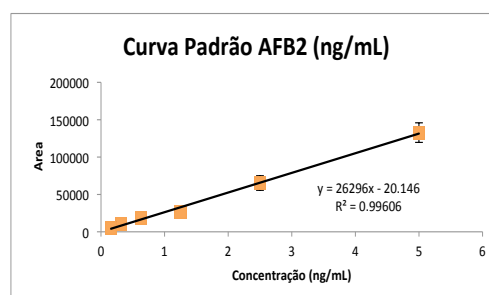
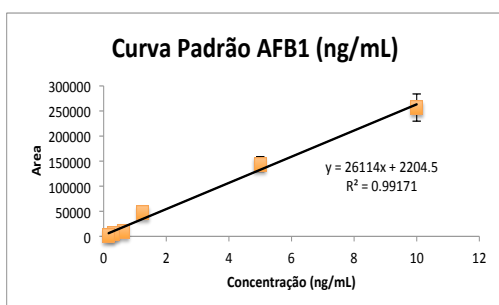
ZECK, A.; WELLER, M.G.; BURSILLB, D.; NIESSNER, R. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. **Analyst**, v.126, p. 2002-2007, 2001b.

# **ANEXO**

## ANEXO A

**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência****1. Análise de Aflatoxinas Totais (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) (AFs)**

- Equipamento: sistema isocrático de fase reversa foi constituído por controlador SCL-10AVp com bomba LC-10AT, detector de fluorescência (RF-10AXL), forno CTO-10AS, degaseificador DGU-20A5 (Shimadzu, Japão).
- Comprimento de onda de excitação: 365 nm
- Comprimento de onda de emissão: 450 nm
- Coluna: coluna LUNA C-18 (250x4,6 mm, 5 $\mu$ , 100 A) (Phenomenex, USA)
- Coluna de guarda: Security Guard (Phenomenex, USA)
- Fase móvel: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (32:68, v/v)
- Vazão: 1 mL/min
- Temperatura de Forno: 40 °C
- Volume de injeção: 20  $\mu$ L
- Tempo de análise: 15 min
- Derivatização pré-coluna: TFA - 100  $\mu$ L de TFA foi adicionado no extrato seco, incubado por 20 minutos e acrescido de 900  $\mu$ L de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1, v/v)
- Tempo de retenção:
  - G1: 5,06 – 5,10 min
  - B1: 5,77 – 5,81 min
  - G2: 9,9 – 10,11 min
  - B2: 12,51 – 12,64 min
- Curva Padrão



- Recuperação (n=2)

	ng/mL	Recuperado	Recuperação	CV
AFB1	2.5	2.6±0.02	104%	1%
	7.5	9.3±0.5	124%	5%
	18.75	212.1±4.5	113%	21%
AFB2	0.5	0.6±0.1	125%	13%
	2.5	2.6±0.1	102%	6%
	6.25	6.3±0.3	101%	4%
AFG1	2.5	2.1±0.1	85%	4%
	7.5	10.3±0.2	137%	1%
	18.75	19.0±10.6	102%	56%
AFG2	0.5	0.5±0.01	105%	3%
	2.5	2.0±0.1	83%	3%
	6.25	5.7±1.1	90%	19%
AFs	6	5.9±0.10	98%	0.2%
	20	24.2±0.9	121%	4%
	50	52.1±14.3	104%	27%

Análise realizada em duplicata.

- Cromatograma de Aflatoxina em milho

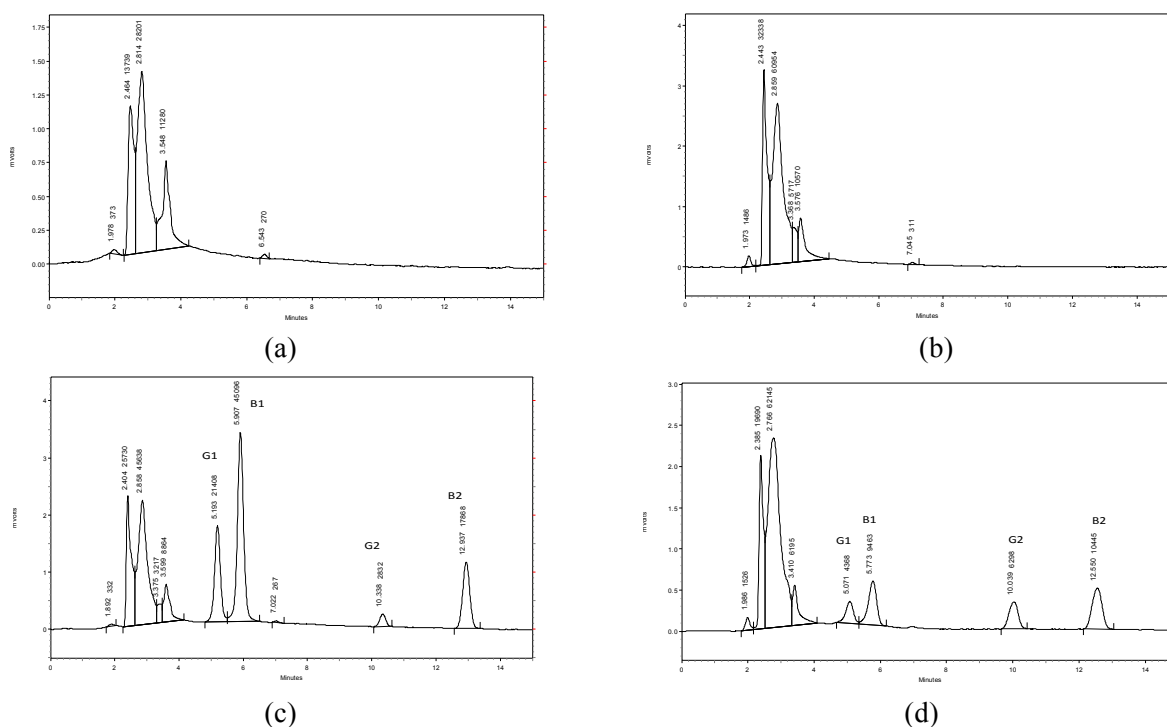
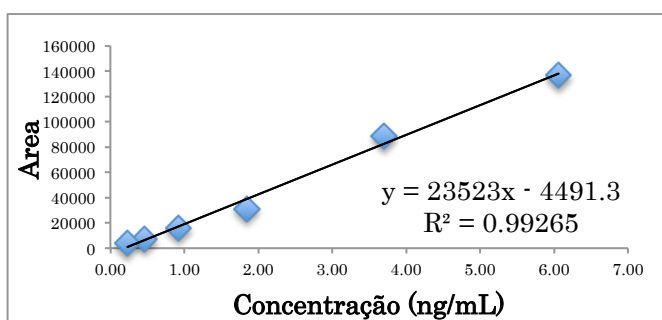


Figura 1 – Cromatograma (a) solução do pré-derivatizante (100µL TFA + 900 µL CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1, v/v)); (b) AFs não detectada em milho; (c) Milho contaminado com 6 µg/Kg de AFs; (d) Milho naturalmente contaminado

## 2. Análise de Desoxinivalenol

- Equipamento: sistema isocrático de fase reversa foi constituído por controlador CBM-20<sup>A</sup> com bomba LC-20AD, detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno CTO-20AC e desgaseificador DGU-20A5 (Shimadzu, Japão) e injetor (modelo 7755-022, Rheodyne, USA).
- Comprimento de onda monitorado: 222 nm
- Coluna: coluna LUNA C-18 (250x4,6 mm, 5 $\mu$ , 100 A) (Phenomenex, USA)
- Coluna de guarda: C-18 Security Guard, Phenomenex, USA
- Fase móvel: metanol:H<sub>2</sub>O (30:70, v/v)
- Vazão: 1,2 mL/min
- Temperatura de Forno: 25 °C
- Ressuspensão de amostra: 100  $\mu$ L em metanol
- Volume de injeção: 20  $\mu$ L
- Tempo de análise: 10 ou 13min
- Tempo de retenção: 5,6-5,8 min (10 min) e 6,6-7 min (13 min)
- Curva Padrão



### Recuperação (n=2)

Matriz	DON ( $\mu$ g/Kg)	HPLC		
		Recuperado	Recuperação (%)	CV (%)
Milho*	500	521.5 $\pm$ 17.8	104	3
	1000	729.5 $\pm$ 21.7	73	3
	2000	1390.0 $\pm$ 9.5	70	1
Biscoito**	500	488.9 $\pm$ 107.4	98	22%
	1000	835.2 $\pm$ 77.2	84	9%
	2000	2070.0 $\pm$ 207.5	104	10%

\*Análise realizada em duplicata

\*\* Biscoito tipo Maizena, Maria, Cream cracker, Agua sal (média de recuperação)

- Cromatograma de Desoxinivalenol em Milho

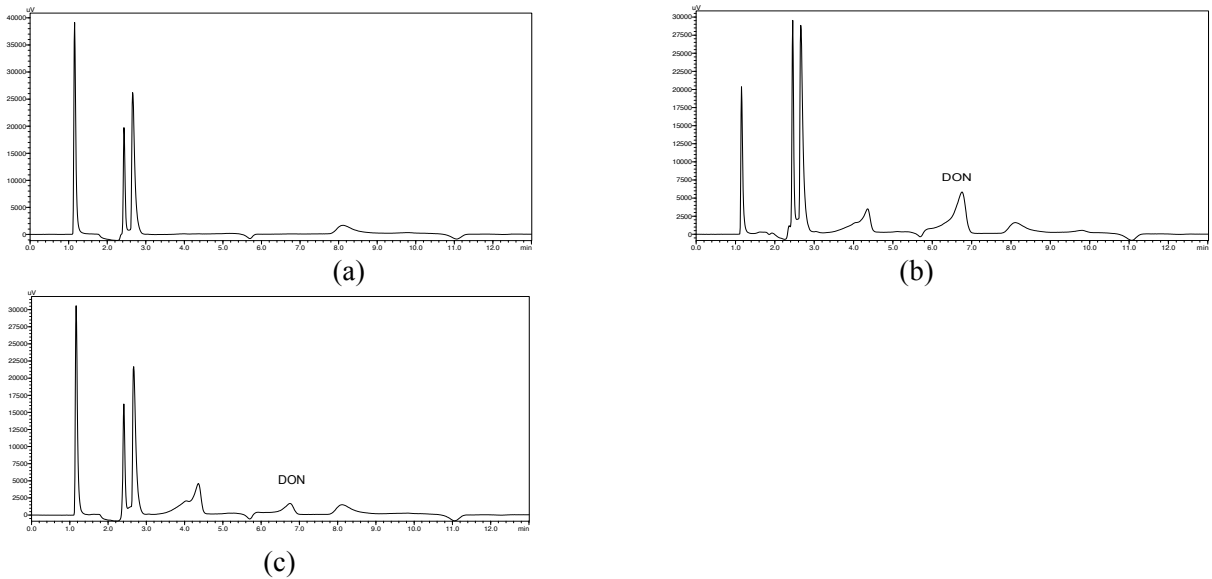


Figura 2 - Cromatograma (a) DON não detectado em Milho; (b) Milho contaminado com 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de DON; (c) Milho naturalmente contaminado

- Cromatograma de Desoxinivalenol em Biscoito

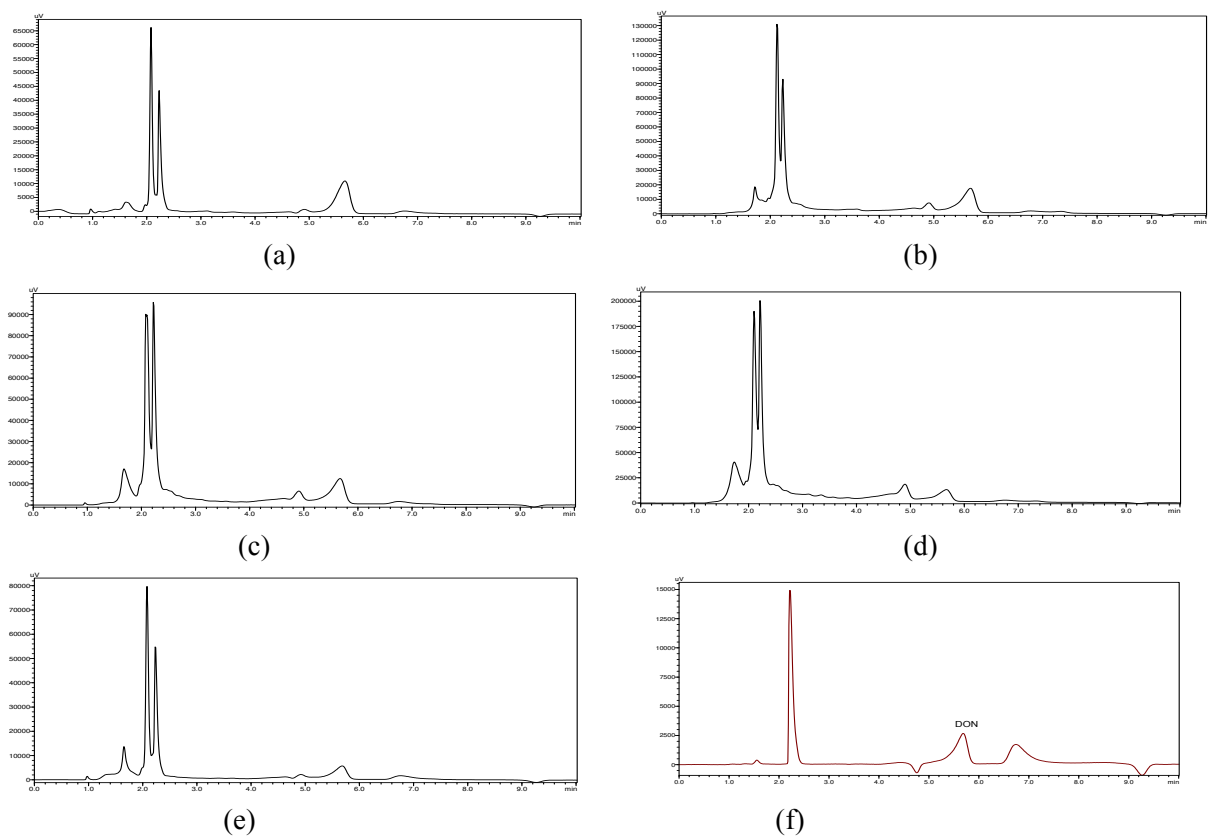
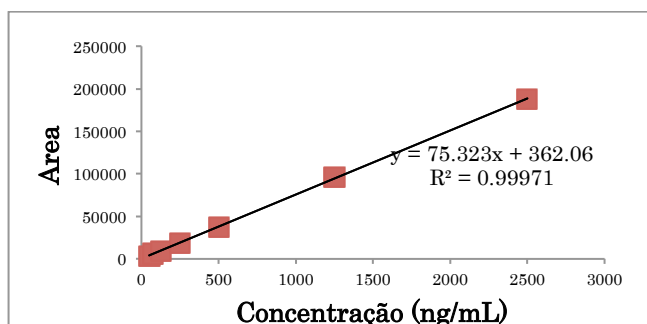


Figura 3 - Cromatograma (a) Biscoito tipo maizena contaminado com 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de DON; (b) Biscoito tipo maria contaminado com 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de DON; (c) Biscoito tipo cream cracker contaminado com 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de DON; (d) Biscoito tipo água e sal contaminado com 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de DON; (e) Biscoito tipo cream cracker naturalmente contaminado; (f) Padrão de DON (3,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

### 3. Análise de Zearalenona

- Equipamento: sistema isocrático de fase reversa foi constituído por controlador CBM-20<sup>A</sup> com bomba LC-20AD, detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno CTO-20AC e desgaseificador DGU-20A5 (Shimadzu, Japão) e e injetor (modelo 7755-022, Rheodyne, USA).
- Comprimento de onda monitorado: 276 nm
- Coluna: coluna LUNA C-18 (250x4,6 mm, 5 $\mu$ , 100 A) (Phenomenex, USA)
- Coluna de guarda: C-18 Security Guard, Phenomenex, USA
- Fase móvel: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v),
- Vazão: 1 mL/min
- Temperatura de Forno: 40 °C
- Ressuspensão de amostra: 100  $\mu$ L em CH<sub>3</sub>CN
- Volume de injeção: 20  $\mu$ L
- Tempo de análise: 16 min, 20 min
- Tempo de retenção: 12,2-12,8 min (16 min), 14 min (20 min)
- Curva Padrão



- Recuperação (n=2)

Matriz	ZEA ( $\mu$ g/Kg)	HPLC		
		Recuperado	Media de Recuperação	CV (%)
Milho*	100	80.4 $\pm$ 0.3	80	0.4
	300	323.5 $\pm$ 132.7	108	41
	500	400.3 $\pm$ 19.5	80	5
Trigo*	100	105.8 $\pm$ 10.1	106	10
	200	149.4 $\pm$ 33.1	75	22
	400	207.5 $\pm$ 47	41	22
Biscoito**	50	37.5 $\pm$ 6.8	75	18%
	100	656 $\pm$ 11.7	66	18%
	200	133.7 $\pm$ 19.3	67	15%

\*Análise realizada em duplicata

\*\* Biscoito tipo Maizena, Maria, Cream cracker, Agua sal (média de recuperação)

- Cromatograma de Zearalenona em Milho

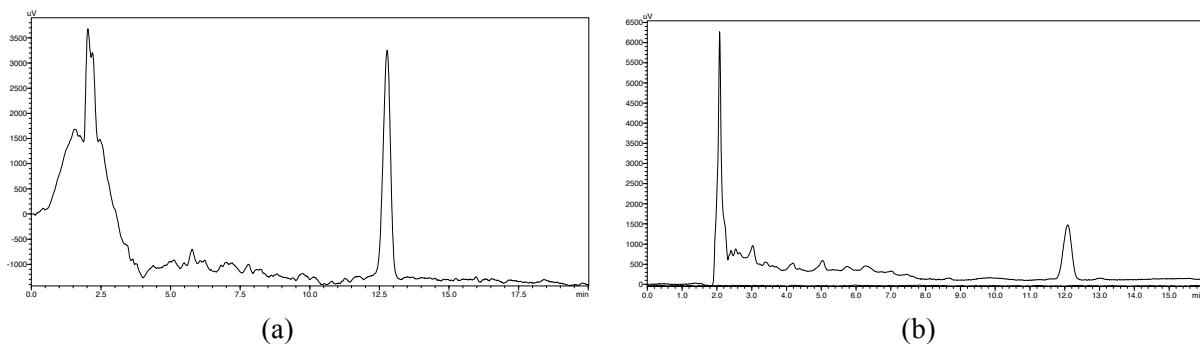


Figura 4 - Cromatograma (a) Milho contaminado com 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de ZEA; (b) Milho naturalmente contaminado.

- Cromatograma de Zearalenona em Trigo

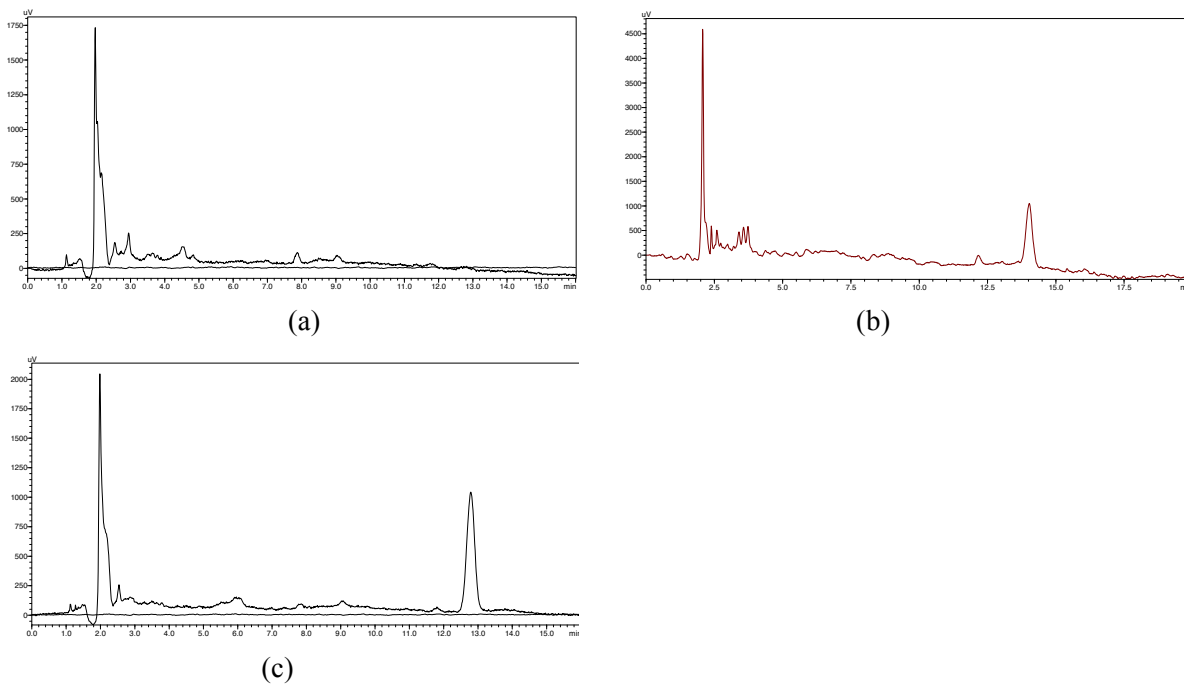


Figura 5 - Cromatograma (a) ZEA não detectado em Trigo; (b) Trigo contaminado com 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de ZEA; (c) Trigo naturalmente contaminado

- Cromatograma de Zearalenona em Biscoito

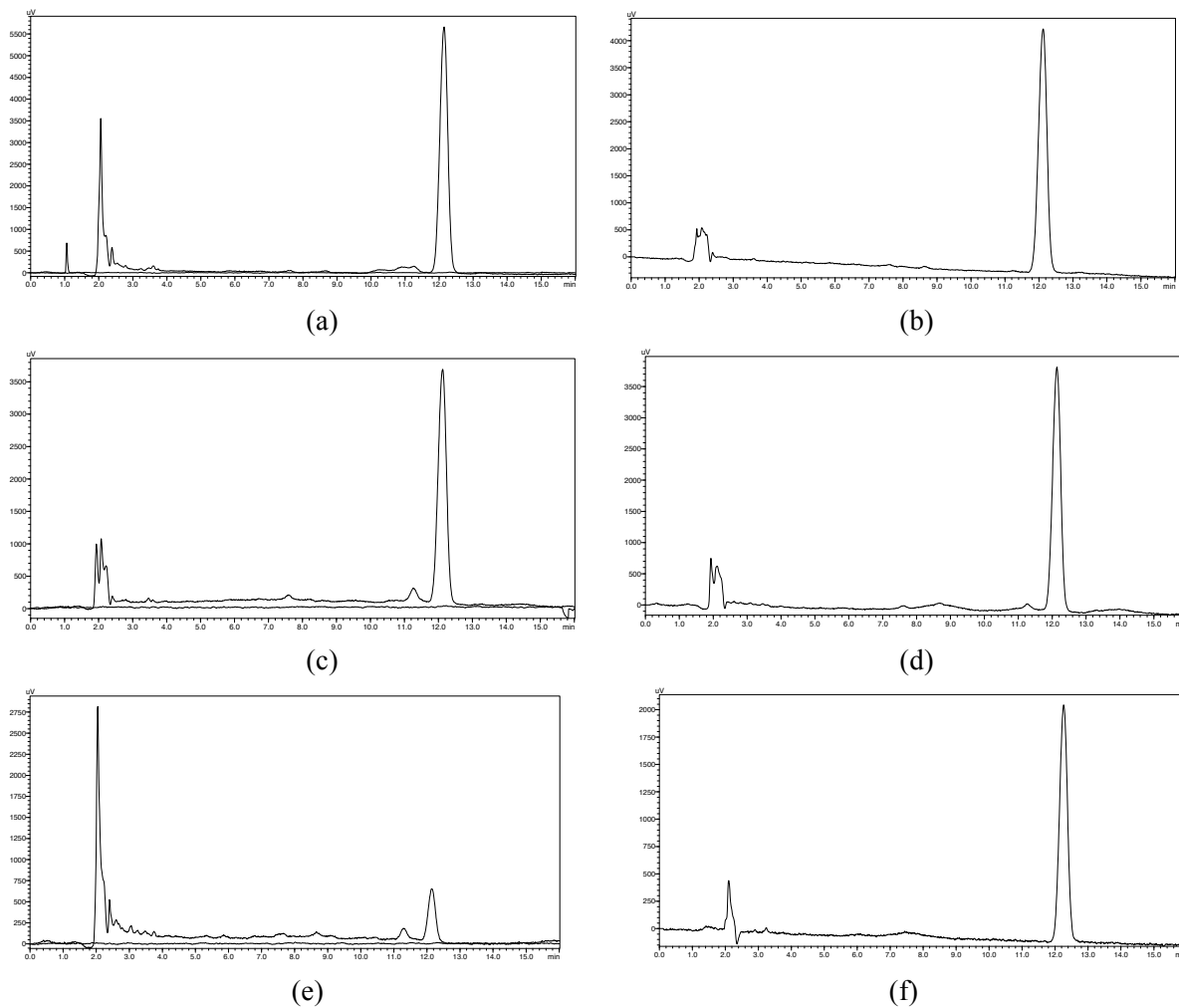


Figura 6 - Cromatograma (a) Biscoito tipo maizena contaminado com 100 µg/Kg de ZEA; (b) Biscoito tipo maria contaminado com 100 µg/Kg de ZEA; (c) Biscoito tipo cream cracker contaminado com 1000 µg/Kg de DON; (d) Biscoito tipo água e sal contaminado com 100 µg/Kg de ZEA; (e) Biscoito tipo cream cracker naturalmente contaminado; (f) Padrão de DON (250 ng/mL);

## ANEXO B

- **Tabela de limite máximo tolerados para micotoxinas em matrizes estudadas pela legislação brasileira (aplicação até 2016, Resolução RDC nº 07, de 18, 2011) e Europeia (Regulamento (CE) nº1881/2006 e (CE) No 1126/2007)**

Micotoxina	Milho		Trigo		Biscoito	
	Brasil/2011	EU/2006	Brasil/2011	EU/2006	Brasil/2011	EU/2006
AFs (µg/Kg)*	20	10				
DON (µg/Kg)	3000	1750	1000	1250	750	500
ZEA (µg/Kg)	400	350	200	100	100	50

\* AFs = soma de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2

- **Tabela de recuperação de dois métodos (ic-ELISA e CLAE) empregado para análise de micotoxinas em matrizes estudadas,**

Matriz	Micotoxinas	Toxina (µg/Kg)	ic-ELISA			CLAE		
			Recuperado	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperado	Recuperação (%)	CV (%)
Milho	Aflatoxinas Totais	6	6.8 ± 1.4	113	20	5.9 ± 0.1	98	0.2
		20	21.1 ± 1.8	106	9	24.2 ± 0.9	121	4
		50	52.0 ± 3.4	104	6	52.2 ± 14.3	104	27
	Deoxinivalenol	500	511.2 ± 53.7	102	11	521.5 ± 17.8	104	3
		1000	1062.1 ± 77.7	106	7	729.5 ± 21.7	73	3
		2000	2125.9 ± 174.7	106	8	1390.0 ± 9.5	70	1
	Zearalenona	100	97.6 ± 3.7	98	4	80.4 ± 0.3	80	0.4
		300	323.3 ± 29.9	108	9	323.5 ± 132.7	108	41
		500	507 ± 17.1	101	3	400.3 ± 19.5	80	5
Trigo	Zearalenona	100	102 ± 8.6	102	8	105.8 ± 10.1	106	10
		200	195 ± 4.6	97	2	149.4 ± 33.1	75	22
		400	449.4 ± 8.3	112	2	207.5 ± 47	41	22
Biscoito*	Deoxinivalenol	500	492.3 ± 38.7	98	8	488.9 ± 107.4	98	2
		1000	953.7 ± 28.2	95	3	835.2 ± 77.2	84	9
		2000	2121.9 ± 143.3	106	7	2070.0 ± 207.5	104	10
	Zearalenona	50	51.0 ± 3.8	102	7	37.5 ± 6.8	75	18
		100	106.4 ± 9.4	105	9	656 ± 11.7	66	18
		200	192.7 ± 7.3	96	4	133.7 ± 19.3	67	15

\* Biscoito tipo Maizena, Maria, Cream cracker, Agua sal

• Tabela de detecção de micotoxinas em Milho por ic-ELISA e CLAE

Amostra	AF		DON		ZEA	
	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)	ic-ELISA (µg/Kg)	CLAE (µg/Kg)
1	7.3	7.4	nd	48.1	nd	nd
2	nd	nd	nd	42.6	nd	nd
3	6.0	nd	nd	nd	nd	nd
4	nq	nd	nd	nd	nd	nd
5	nq	nd	nq	nq	nd	6.4
6	nd	nd	nq	nd	nd	nd
7	nd	nd	nd	225.1	nd	27.4
8	nq	nd	nd	157.6	nq	24.5
9	nd	nd	nd	nd	128.4	123.0
10	nq	nd	nq	229.0	598.7	575.8
11	nd	nd	nd	nq	nd	31.3
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	6.8	nd	1150.4	nd	509.3	218.8
14	nq	nd	nd	134.2	1428.8	1002.7
15	nd	nd	nd	82.7	nd	20.7
16	nd	nd	nd	61.7	nd	4.6
17	nq	nd	nd	nq	nq	4.1
18	nq	nd	nd	nd	nd	nd
19	nq	nd	nd	nd	nd	nd
20	10.8	10.3	nd	nq	nd	6.1
21	nd	nd	nd	59.4	nd	3.1
22	nq	nd	nd	39.3	nd	nd
23	nq	nd	nd	194.2	nd	7.0
24	nq	nd	nd	85.2	nq	nq
25	nq	nd	nd	76.9	nq	32.6
26	nd	nd	nd	184.5	115.4	93.1
27	7.7	nd	nd	nd	nd	5.2
28	nd	nd	nd	nd	nq	nd
29	nq	nd	nd	nq	387.0	358.3
30	nd	nd	nd	60.4	nd	6.3
31	nd	nd	nq	188.3	nd	nd
32	nd	nd	nq	242.7	nd	10.2
33	nq	nd	806.6	151.8	1161.4	688.1
34	nd	nd	nd	216.7	nd	nd
35	7.4	7.8	nd	51.0	467.1	441.5
36	nq	nd	nd	211.3	545.5	469.4
37	nd	nd	nd	84.1	nd	28.3
38	nd	nd	nq	43.3	nd	26.1
39	5.7	nd	nd	51.1	nq	12.2
40	nq	nd	nq	49.8	202.0	179.1
41	11.2	9.5	nq	87.5	nq	30.9
42	nd	nd	nq	196.3	140.3	125.9
43	nd	3.8	nq	253.9	nd	91.9
44	nd	nd	nq	nd	nd	58.7
45	nd	nd	nd	252.9	165.0	5.2
46	nd	nd	nd	255.2	270.4	223.1
47	nd	nd	1327.7	233.6	nd	63.2
48	4.9	nd	nd	nd	1458.7	839.4
49	nd	nd	nd	33.5	345.6	276.7
50	nd	nd	nd	nd	nq	42.3
51	nq	nd	nd	178.4	202.7	136.1
52	nq	nd	nd	129.3	837.8	636.8
53	nd	nd	nd	173.1	1701.2	1634.9
54	nd	nd	nd	nd	141.7	101.9
55	nq	nd	nd	nd	388.6	430.3
56	nq	nd	nq	58.2	nq	29.4
57	nd	nd	nd	47.4	1132.6	777.1
58	nq	3.1	nd	191.5	272.3	274.8
59	nd	nd	nd	177.5	nq	nd
60	nq	nd	nd	nq	nq	nd
61	nd	nd	nq	148.1	496.4	1349.8
62	nd	nd	nq	373.9	844.9	768.0
63	nq	2.2	nd	170.5	413.8	1035.6
64	nq	1.4	nq	nd	274.5	152.1
65	10.5	12.5	nq	244.7	513.4	317.9
66	6.8	7.0	nd	120.9	322.9	374.9
67	nq	4.1	nd	207.6	278.8	558.4
68	nq	nd	nq	284.0	296.3	263.7
69	nq	nd	nq	nd	315.1	291.9
70	nq	nd	nd	nd	205.8	197.9
71	nq	nd	nd	nq	525.5	523.2
72	nq	nd	1327.7	3226.1	d	13.4
73	nq	nd	3656.9	2316.4	1168.1	591.2
74	nq	nd	4584.4	4324.5	309.8	249.0
75	11.5	10.8	nd	nq	236.5	374.8

• Tabela de detecção de micotoxinas em Biscoito por ic-ELISA e CLAE

Amostra	DON		ZEA	
	ic-ELISA (µg/Kg)	OLAE (µg/Kg)	ic-ELISA (µg/Kg)	OLAE (µg/Kg)
Maizena A	614.5	38.9	nd	6.1
Maizena B	nq	267.5	nd	nd
Maizena C	nq	147.0	nd	nd
Maizena D	nq	287.8	nd	3.3
Maizena E	nd	95.0	nd	nd
Maizena F	nq	377.8	nd	nd
Maizena G	nd	82.8	nd	nq
Maizena H	nq	88.4	nd	nd
Maizena I	434.5	273.6	31.3	4.7
Maizenas J	564.6	469.0	nd	nd
Maizena K	nd	378.6	84.2	7.8
Maizena L	nd	342.8	nd	4.5
Maria A	675.0	508.1	60.9	3.7
Maria B	nq	84.6	nd	nq
Maria C	nq	70.6	52.7	5.4
Maria D	503.4	346.2	nd	nq
Maria E	nd	63.1	nd	nd
Maria F	nq	51.3	nd	5.2
Maria G	574.8	194.5	34.0	37.9
Maria H	nq	227.5	35.2	2.9
Maria I	603.9	66.2	nq	14.7
Maria J	441.4	218.4	95.0	8.7
Cream Cracker A	nq	276.6	24.5	nq
Cream Cracker B	nd	218.8	nd	0.9
Cream Cracker C	nd	198.4	66.5	nd
Cream Cracker D	598.5	106.8	92.2	nd
Cream Cracker E	nq	163.6	nd	nd
Cream Cracker F	nd	345.4	nd	nd
Cream Cracker G	nq	311.7	nd	nd
Cream Cracker H	806.3	1043.0	nd	nd
Cream Cracker I	607.4	107.8	nd	4.0
Cream Cracker J	1119.8	20.7	nd	4.7
Cream Cracker K	523.2	783.3	nq	15.0
Cream Cracker L	nd	351.1	nd	3.3
Cream Cracker M	619.5	80.6	30.9	nd
Cream Cracker N	nq	135.6	53.4	nd
Cream Cracker O	1078.5	1290.4	nd	nd
Cream Cracker P	458.7	62.9	nd	nd
Cream Cracker Q	1706.9	2097.5	60.1	8.3
Cream Cracker R	705.0	445.2	nd	nq
Cream Cracker S	522.6	53.3	55.9	nq
Água Sal A	nq	218.0	nd	6.2
Água Sal B	714.2	1993.1	29.9	nd
Água Sal C	nq	181.2	nd	nq
Água Sal D	1042.6	1352.3	67.0	nq
Água Sal E	nd	290.0	nd	nq
Água sal F	438.2	269.3	nd	3.0
Água Sal G	855.2	909.9	51.9	8.5
Água Sal H	2031.0	1612.3	nd	17.6
Água Sal I	847.9	1031.1	nq	10.7
Água Sal J	439.1	421.6	nd	nq
Água Sal K	927.2	998.6	nd	3.1
Água sal L	939.7	589.5	nd	nd
Água Sal M	810.2	1872.2	nq	5.3
Água Sal N	nq	231.5	nq	12.4
Água Sal O	447.3	58.1	nd	3.4

- Tabela de detecção de micotoxinas em Trigo por ic-ELISA e CLAE

Amostra	ZEA		Amostra	ZEA	
	ic-ELISA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	CLAE ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )		ic-ELISA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	CLAE ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
1	111.8	28.5	20	nd	8.6
2	281.8	358.8	21	nd	6.5
3	90.7	21.4	22	nd	3.9
4	94.4	34.6	23	nd	16.1
5	146.7	17.2	24	nd	13
6	nq	3.2	25	nd	3.1
7	nq	4.9	26	nd	12.9
8	nq	6.2	27	nd	14.9
9	nq	10.3	28	nd	5.8
10	nq	11.2	29	nd	4
11	nq	13.9	30	nd	8.3
12	nq	16.3	31	nd	14.5
13	nq	20.1	32	nd	8.5
14	nq	25.4	33	nd	20.8
15	nq	60.3	34	nd	10.2
16	nd	18.8	2 amostras	nq	nq
17	nd	7.2	7 amostras	nq	nd
18	nd	9.9	8 amostras	nd	nq
19	nd	11.1	74 amostras	nd	nd