**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**VANESSA OLINTO DOS SANTOS EVANGELISTA**

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES DE FLUXO LATERAL PARA A DETECÇÃO DE CULTIVARES GENETICAMENTE MODIFICADOS E DE AFLATOXINAS EM PRODUTOS AGRÍCOLAS

**NATAL**
**2015**

**VANESSA OLINTO DOS SANTOS EVANGELISTA**

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES DE FLUXO LATERAL PARA A DETECÇÃO DE CULTIVARES GENETICAMENTE MODIFICADOS E DE AFLATOXINAS EM PRODUTOS AGRÍCOLAS

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica

Orientadora:

Drª Maria Fátima Grossi de Sá

**NATAL/RN**
**2015**

UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede
Catalogação da Publicação na Fonte

Evangelista, Vanessa Olinto dos Santos.
Desenvolvimento e validação de testes de fluxo lateral para a detecção de cultivares geneticamente modificados e de aflatoxinas em produtos agrícolas / Vanessa Olinto dos Santos Evangelista. – Natal, 2015.
138 f. : il.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Fátima Grossi de Sá.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Segurança alimentar – Tese. 2. Aflatoxinas - Tese. 3. Detecção de cultivares GM - Tese. 4. Proteínas Cry - Tese. 5. Testes de fluxo lateral - Tese. I. Sá, Maria de Fátima Grosso de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM CDU 614.448

**VANESSA OLINTO DOS SANTOS EVANGELISTA**

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTES DE FLUXO LATERAL PARA A DETECÇÃO DE CULTIVARES GENETICAMENTE MODIFICADOS E DE AFLATOXINAS EM PRODUTOS AGRÍCOLAS

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Aprovado em: 03/12/2015

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Fátima G. De Sá
EMBRAPA/CENARGEN
Orientadora

Profa. Dra. Adriana Ferreira Uchoa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Examinadora Interna ao Programa

Profa. Dra. Suely Ferreira Chavante
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Examinadora Interna ao Programa

Prof. Dr. Hermógenes David De Oliveira
Universidade do Ceará - UFC
Examinador Externo à Instituição

Profa. Dra. Maria Cristina Mattar Da Silva - EMBRAPA
Examinadora Externa à Instituição

*“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido,*
*Mas aquele que vai acompanhado,*
*Com certeza vai mais longe*”

Clarice Lispector

Dedico essa obra

*Ao meu esposo e amigo Ismail e a minha filha Isabelle, minha continuidade, meu amor maior, meu coração é de vocês!*

*Aos meus pais, Jonas & Erineide e as minhas irmãs: Vivian, Lidiane e Joyce, pelo apoio, ajuda e incentivo. Amo muito vocês!*

*Aos meu avós: João Celestino (in memorium) & Terezinha dos Santos pelo cuidado, carinho e orações.*

*“O Senhor é a minha força e o meu escudo*

*Nele o meu coração confia e dele recebo ajuda*

*Meu coração exulta de alegria*

*Com o meu cântico lhe darei graças”*

*Salmos 28:7 NVI*

**AGRADECIMENTOS**

A Deus, meu refúgio, meu sustento, minha fortaleza a alegria da minha vida. A ele toda a glória!

À minha Orientadora: Drª Maria Fátima Grossi de sá, pelo exemplo de amor a ciência e pelo esforço contínuo em oferecer aos seus alunos a excelência no desenvolvimento da pesquisa. Você é merecedora de todo o reconhecimento.

À Drª Samira Bührer-Sekula, por ceder seu laboratório, seu equipamento, seus alunos, para que eu pudesse aprender a produzir as fitas-testes

A Rodrigo Scaliante e Ludimilia Cardoso pelos ensinamento na produção das fitas-testes

Aos meus amigos: Carol, Leo, Ariane, Djair, Roberta, JaJá & família, pelo carinho, pela companhia, durante todos esses anos em Brasília/DF. Vocês fazem parte da minha vida.

A todos os pesquisadores da EMBRAPA- Recursos Genéticos e Biotecnologia principalmente, ao Dr. Thales Lima Rocha e a Drª Cristina Mattar, pela receptividade no laboratório, pelo profissionalismo e pela disposição em sempre colaborar com o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LPPI)- EMBRAPA/CENARGEN: Regina, Raquel, Flavinha, Antônio Américo, Dudu, Rafael, Angelina, Thiago, Gustavo, Hudson, Erick, Isabela, Rodrigo, Vivian, Alessandra, Edilson, Maíra, Diogo, Relinda, Ivaldo, Simoni, Paulo Henrique, Charles, Érico, Magda, Sineide, Sheiska e Lecir

Á Fernanda Mulinari pela orientação inicial, pelos ensinamentos na cultura celular

À Patrícia Pelegrini pela colaboração nos experimentos desenvolvidos nesse trabalho, pela correção dos artigos e pela ajuda no que eu precisasse.

À Drª. Sandra Farias, da UFRGS, pelo ensinamentos na produção dos anticorpos monoclonais e pela receptividade em me acolher no seu laboratório.

À professora Wirla Tamashiro, da UNICAMP, pela receptividade em me acolher no seu laboratório, pelos ensinamentos e “dicas” na cultura dos hibridomas.

Aos Professores da minha banca de qualificação: Dr. Marcelo de Sousa da Silva, Drª. Adriana Ferreira Uchoa e Drª Janeusa Trindade de Souto e aos professores da minha banca de defesa: Drª Maria Cristina Mattar da Silva, Dr. Hermógenes David de Oliveira, Drª Suely Ferreira Chavante e Drª Adriana Ferreira Uchoa pela disponibilidade em avaliar esse trabalho e contribuir significativamente para a elaboração desse manuscrito.

Aos meus amigos e funcionários do departamento de Bioquímica

Aos professores do Departamento de Bioquímica e ao Programa de pós graduação, em especial a Professora Kátia Scortecci (Coordenadora) e o professor Hugo Rocha (Vice-Coordenador).

Ao apoio financeiro do CNPq para o desenvolvimento desse projeto e a bolsa concedida pela CAPES, através do convênio com a EMBRAPA.

## RESUMO

A expansão agrícola com cultivares geneticamente modificados (GM) é fenômeno mundial. Esse fato tem impulsionado a implementação de legislações regulatórias para monitorar à presença de variedades GM em culturas agrícolas. Outra importante demanda mundial está relacionada ao consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas. Essas moléculas constituem um classe de compostos extremamente tóxicos que causam efeitos danosos para a saúde humana e animal. Por isso, a segurança e qualidade dos produtos agrícolas são essenciais para os consumidores. Os testes de fluxo lateral são métodos promissores tanto para a detecção de proteínas expressas em culturas GM quanto para a detecção de afaltoxinas em alimentos. Nesse estudo foram desenvolvidos dois testes de fluxo lateral para a detecção: (i) das proteínas Cry1Ac e Cry8 Ka5, expressas em cultivares de algodão GM e; (ii) de aflatoxinas em produtos agrícolas. O primeiro teste foi desenvolvido no formato *sandwhich*, enquanto que o segundo teste foi desenvolvido no formato competitivo. Partículas de ouro coloidal foram utilizadas como reagentes de detecção, quando conjugados com anticorpos monoclonais. O anticorpo anti-espécie ( anti-mouse IgG) foi adsorvido na membrana de nitrocelulose, na região designada como linha controle. Os testes no formato *sandwhich* foram validados utilizando amostras de folhas do algodoeiro GM (Bollgard I ® e Planta 50- EMBRAPA) e não GM (Cooker 312). Os resultados demonstraram que esse teste foi capaz de distinguir eficientemente amostras GM de não GM. OS testes no formato competitivo foram validados utilizando amostras de grãos de soja contaminados com o fungo *Aspergillus flavus*. Amostras de leite e proteína texturizada de soja também foram utilizados nos ensaios de validação. Os resultados demonstraram

que o teste eficientemente identificou amostras contaminadas por aflatoxinas, com sensibilidade de 0,5 ng/mL ou 0,5 µg/Kg. Diante disso, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que as fitas testes desenvolvidas podem ser utilizadas como método rápido e de baixo custo para a detecção de cultivares GM resistentes a insetos praga, expressando as proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5, assim como para a detecção de aflatoxinas em amostras alimentares.

Palavras-chave: Testes de fluxo lateral; Proteínas Cry; Testes rápidos; Detecção de cultivares GM; Aflatoxinas; Segurança alimentar

## ABSTRACT

The expansion of cultivated areas with genetically modified crops (GM) is a worldwide phenomenon, stimulating regulatory authorities to implement strict procedures to monitor and verify the presence of GM varieties in agricultural crops. With the constant growing of plant cultivating areas all over the world, consumption of aflatoxin-contaminated food also increased. Aflatoxins correspond to a class of highly toxic contaminants found in agricultural products that can have harmful effects on human and animal health. Therefore, the safety and quality evaluation of agricultural products are important issues for consumers. Lateral flow tests (strip tests) is a promising method for the detection both proteins expressed in GM crops and aflatoxins-contaminated food samples. The advantages of this technique include its simplicity, rapidity and cost-effective when compared to the conventional methods. In this study, two novel and sensitive strip tests assay were developed for the identification of: (i) Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins expressed in GM cotton crops and; (ii) aflatoxins from agricultural products. The first strip test was developed using a sandwhich format, while the second one was developed using a competitive format. Gold colloidal nanoparticles were used as detector reagent when coated with monoclonal antibodies. An anti-species specific antibody was sprayed at the nitrocellulose membrane to be used as a control line. To validate the first strip test, GM (Bollgard I® e Planta 50- EMBRAPA) and non-GM cotton leaf (Cooker 312) were used. The results showed that the strip containing antibodies for the identification of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins was capable of correctly distinguishing between GM samples (positive result) and non-GM samples (negative result), in a high sensitivity manner. To validate the second strip test, artificially contaminated

soybean with *Aspergillus flavus* (aflatoxin-producing fungus) was employed. Food samples, such as milk and soybean, were also evaluated for the presence of aflatoxins. The strip test was capable to distinguish between samples with and without aflatoxins samples, at a sensitivity concentration of 0,5 µg/Kg. Therefore, these results suggest that the strip tests developed in this study can be a potential tool as a rapid and cost-effective method for detection of insect resistant GM crops expressing Cry1Ac and Cry8Ka5 and aflatoxins from food samples.

Keywords: Lateral flow test; strip test; rapid test; detection GM crops; aflatoxins and food safety.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Organismos susceptíveis a ação das δ-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis (Bt)*.....25

FIGURA 2: Modelos proposto para o mecanismo de ação das toxinas Cry em insetos alvo. .....28

FIGURA 3: Estrutura primária e terciária das toxinas Cry. (a) tamanho relativo das protoxinas e posição das regiões conservadas. .....30

FIGURA 4: Modelo estrutural da proteína Cry8Ka1 e as indicações das posições dos aminoácidos substituídos na toxina mutante Cry8Ka5. .....33

FIGURA 5: Mapa global dos cultivares transgênicos comercializados em 2014. *Fonte:* James, 2014.....34

FIGURA 6: Configuração típica de um teste de fluxo lateral. .....39

FIGURA 7: Formato direto ou “sandwich” dos testes de fluxo lateral. Fonte: Farell, B.O, 2009, com modificações.....41

FIGURA 8: Formato competitivo dos testes de fluxo lateral. Fonte**:** Farell, B.O, 2009 com modificações .....42

FIGURA 9: Fluxograma da rastreabilidade agrícola.....44

FIGURA 10: Fluxograma da metodologia utilizada para a produção dos testes de fluxo lateral.....46

FIGURA 11: Representação dos vetores utilizados para a expressão heteróloga em E.coli.....51

FIGURA 12: Ilustração das etapas envolvidas na produção dos anticorpos monoclonais.....52

FIGURA 13: Etapas do fluxo de produção dos teste imunocromatográficos...66

FIGURA 14: Perfil eletroforético sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) da expressão e purificação das proteínas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5.....71

FIGURA 15: Sorologia dos camundongos imunizados com a proteína Cry1A.....72

FIGURA 16: ELISA indireto dos sobrenadantes da cultura celular dos hibridomas α-Cry 1Ac.....73

FIGURA 17: ELISA Indireto dos sobrenadantes dos hibridomas α-Cry1Ac após clonagem.....74

FIGURA 18: SDS-PAGE dos anticorpos monoclonais (AcMos) α-Cry1Ac.....75

FIGURA 19: ELISA Indireto da reação cruzada dos anticorpos α-Cry1Ac contra a proteína recombinante Cry8Ka5.....76

FIGURA 20: ELISA Indireto, dos epítopos da proteína Cry1Ac reconhecidos pelos anticorpos monoclonais..... 77

FIGURA 21: Interação dos anticorpos monoclonais α-Cry1Ac através de ELISA de captura.....78

FIGURA 22: Formato e princípio do teste desenvolvido para a detecção das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5 expressas em cultivares GM.....79

FIGURA 23: Determinação da concentração do anticorpo α-Cry1Ac 1B1 utilizada nos procedimentos de conjugação com nanopartículas de ouro coloidal (40nm).....80

FIGURA 24: Padronização da concentração do anticorpo α-Cry1Ac 5H4 na linha teste.....81

FIGURA 25: Avaliação das fitas imunocromatográficas para a detecção das proteínas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5.....82

FIGURA 26: Sensibilidade e acurácia dos anticorpos monoclonais α-Cry na detecção de cultivares GM.....84

FIGURA 27: Avaliação das fitas testes para a detecção das proteínas transgênicas Cry1Ac e Cry8Ka5 em amostras de folhas GM.....85

FIGURA 28: Sorologia dos camundongos imunizados com a toxina $AFB_1$.....86

FIGURA 29: ELISA indireto dos sobrenadantes da cultura celular dos hibridomas α-AFLAB1..... 87

FIGURA 30: ELISA Indireto dos sobrenadantes da cultura celular dos hibridomas α- AFLAB1..... 88

FIGURA 31: SDS-PAGE dos anticorpos monoclonais (AcMos) α-AFLAB1 purificados através de cromatografia de afinidade.....89

FIGURA 32: Representação esquemática do formato e princípios do teste desenvolvido para a detecção de aflatoxinas.....91

FIGURA 33: Padronização do antígeno AFB1-BSA na linha teste.....92

FIGURA 34: Detecção de aflatoxinas, através dos testes de fluxo lateral, em grãos de soja contaminados.....93

FIGURA 35: Determinação da sensibilidade dos testes de fluxo lateral para a detecção de aflatoxinas em extratos de soja contaminados com *A.flavus*..... 94

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Determinação da subclasse IgG dos anticorpos monoclonais α-Cry1Ac secretados pelos hibridomas após clonagem.....74

TABELA 2 Determinação da subclasse IgG dos anticorpos monoclonais α-AFB1 obtidos a partir dos clones secretores.....88

TABELA 3 Percentual da reatividade cruzada dos anticorpos α-AFLAB1 contra aflatoxinas análogas.....90

TABELA 4 Detecção de aflatoxinas em produtos alimentícios derivados da soja, produzidos e comercializados no Brasil, em 2014.....95

## LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

**GM:** Geneticamente modificado

**HT:** Herbice Tolerance

**IR:** Insect Resistance

***cp4-epsps:*** gene que codifica a proteína EPSPS proveniente da linhagem CP4 da bactéria *A. tumefaciensis*

**EPSPS**: Enzima 5- Enolpiruvoil- Shikimato-3 Fosfato Sintetase

***Bt:*** *Bacillus thuringiensis*

**AF:** Aflatoxina

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**RT-PCR:** Real Time Polymerase Chain Reaction

**HPLC:** High Performance Liquide Chromatography

**ELISA**: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**HRP**: Horseradish peroxidase

**IPTG**: Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside

**LB:** Meio de cultura Luria-Bertani

**EDTA:** Ethylenediamine tetraacetic acid

**DTT:** Dithiothreitol

**PMSF:** Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

**PBS:** Phosphate Buffer Saline

**RMPI:** Roswell Park Memorial Institute

**HT:** Hypoxanthine-Thymidine

**HEPES:** 4-2-hydroxyethyl-1-piperazine ethanesulfonic acid

**PEG:** Polietileno Glicol

**HAT:** Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine

**TMB:** 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine

**BSA:** Bovine Serum Albumin

**PVP:** Polyvinylpyrrolidone

**SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

**AMoc:** Anticorpos monoclonais

**α-Cry1Ac:** Anticorpo anti-Cry1Ac

**α-AflaB$_1$**: Anticorpo anti-AFB$_1$

**TFL: Testes de fluxo lateral**

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO..... 22**

1.1.PROTEÍNAS CRY.....24

**1.1.1. Proteína Cry 1Ac.....31**

**1.1.2. Proteína Cry8Ka5.....32**

**1.2.**IMPORTÂNCIA DOS CULTIVARES GM PARA A AGRICULTURA BRASILEIRA**.....33**

**1**.3.CONTAMINAÇÃO DOS PRODUTOS AGRÍCOLA POR AFLATOXINAS...35

1.4.MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA A DETECÇÃO DE CULTIVARES GM E DE AFLATOXINAS EM PRODUTOS AGROPECUÁRIOS.....36

**1.4.1. Estrutura e princípios dos testes de fluxo lateral (TFLs).....38**

**1.4.2. Aplicações dos testes de fluxo lateral na agricultura.....42**

**2 OBJETIVOS.....45**

2.1. OBJETIVO GERAL.....45

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 45

**3 MATERIAL & MÉTODOS.....,.....46**

3.1.REAGENTES QUÍMICOS E MATERIAIS..... 47

3.2.MATERIAIS BIOLÓGICOS**.....48**

**3.2.1. Microorganismos.....48**

**3.2.2. Linhagem Celular.....48**

**3.2.3. Animais de laboratório.....48**

**3.2.4. Plantas de algodão e grãos de soja.....49**

3.3. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Cry 1AC e Cry8Ka5.....49

3.4. PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-Cry1AC e ANTI-$AFB_1$.....52

**3.4.1. Cultura celular da linhagem Sp2/0 Ag-14.....53**

**3.4.2. Imunização.....54**

**3.4.3. Fusão celular e seleção dos hibridomas.....54**

**3.4.4. Preparação das placas *Feeder Layer*.....55**

**3.4.5.Clonagem dos Hibridomas.....56**

**3.4.6.Produção *in vivo* e purificação dos anticorpos monoclonais.....57**

**3.4.7. Caracterização dos anticorpos monoclonais.....58**

3.5. ENSAIOS DE ELISA.....58

**3.5.1. ELISA Indireto.....58**

**3.5.2. ELISA Competitivo.....59**

**3.5.3. ELISA de Captura.....60**

**3.5.4.Determinação dos níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5 nos cultivares GM:.....60**

**3.5.5. Avaliação da reatividade cruzada dos anticorpos α-Cry1Ac.....61**

**3.5.6. Mapeamento dos epítopos da toxina cry1ac reconhecido pelos anticorpos monoclonais.....62**

3.6. DESENVOLVIMENTO DOS TESTES DE FLUXO LATERAL**.....62**

**3.6.1. Produção e Estabilização das partículas de ouro coloidal.....62**

**3.6.2.Conjugação dos anticorpos monoclonais com nanopartículas de ouro coloidal.....63**

**3.6.3. Preparação dos testes de fluxo lateral no formato *sandwhich.....64***

**3.6.4. Preparação dos testes de fluxo lateral no formato competitivo.....65**

3.7. VALIDAÇÃO DOS TESTES DE FLUXO LATERAL .....66

**3.7.1. Ensaios *in vitro,* utilizando os testes de fluxo lateral, para a detecção da proteínas recombinantes: Cry1Ac e Cry8Ka5.....66**

**3.7.2. Validação dos testes de fluxo lateral para a detecção das proteínas: Cry1Ac e Cry8Ka5 expressas em folhas de algodão transgênico.....67**

**3.7.3. Ensaios *in vitro* para determinar a sensibilidade dos TFL para a detecção de $AFB_1$ .....68**

**3.7.4. Avaliação dos TFLs para a detecção de aflatoxinas em grãos de soja contaminados com o fungo *Aspergillus flavus*.....68**

**3.7.5. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos TFLs para a detecção de aflatoxinas em alimentos.....69**

**3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICA.....70**

**4 RESULTADOS.....71**

4.1.PRODUTO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES: Cry1Ac e Cry8Ka5.....71

4.2. ANÁLISE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS α-Cry1AC .....72

4.3. REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTICORPOS α- Cry1AC.....75

4.4. ANÁLISE DOS EPÍTOPOS DA TOXINA Cry1AC RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS..... 76

4.5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS TFLs PARA A DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry1Ac e Cry8Ka5 EXPRESSAS EM CULTIVARES GM.....78

4.6. ANÁLISE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS α-AFLAB$_1$.....86

4.7.DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS TFLs PARA A DETECÇÃO DE AFLATOXINAS EM PRODUTOS AGRÍCOLAS.....90

**5 DISCUSSÃO.....97**

**6 CONCLUSÕES.....110**

**REFERENCIAS..... 112**

**APENDICE .....125**

A- ARTIGO PUBLICADO.....125

B- ARTIGO À SER SUBMETIDO.....134

**ANEXOS.....122**

**ANEXO-A- ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE DO DOUTORADO.....136**

**ANEXO-B- ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....138**

## 1. INTRODUÇÃO

Modificações genéticas têm sido utilizadas para o melhoramento de cultivares agrícolas, visando atender aos principais desafio da agricultura mundial: as mudanças climáticas e o crescimento populacional (Brune et al., 2013). Cultivares geneticamente modificados (GM) têm contribuído significativamente para o aumento da produtividade agrícola, sem a necessidade de expansão das áreas de cultivo. Além disso, tem contribuído com a redução dos custos com insumos agrícolas (Brookes e Barfoot, 2013). Os principais eventos biotecnológicos disponíveis comercialmente, são os cultivares tolerantes à herbicidas (HT) e os que conferem resistência a insetos-praga (IR).

A tolerância à herbicida é a característica transgênica mais utilizada em todo o mundo. Aproximadamente, 80% de toda a área plantada com culturas GM apresentam essa característica (Green e Owen, 2011). O desenvolvimento desses cultivares é resultado da inserção dos genes mutados: *cp4-epsps*, proveniente de *Agrobacterium tumefaciens*, *zm-2mepsps,* proveniente do milho (*Zea mays, L), do gene gox,* proveniente de *Ochrobactrum anthropi,* cepa LBAA e dos homólogos *pat* e *bar,* proveniente de *Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces hygroscopicus*, respectivamente. Apesar, de toda essa diversidade, os cultivares transgênicos contendo o gene *cp4-epsps* são os mais utilizados comercialmente (Green e Owen, 2011).

A enzima EPSPS (EC 2.5.1.19), codificada pelo gene *epsps*, participa da via do ácido shikimico, através da qual são produzidos os aminoácidos aromáticos, os compostos: lignina, fenólicos, flavonoides e outros metabólicos secundários, que

juntos correspondem a 35% da biomassa da planta (Wang et al., 2014). Na presença do herbicida glifosato, ocorre a inibição essa via, resultando no enfraquecimento da planta (Funke et al., 2006). O glifosato, por ser um herbicida sistêmico, e eficiente para o controle de ervas daninhas, tem sido amplamente utilizado na agricultura mundial. Sua adoção generalizada, associada a ausência de um manejo agrícola adequado, desencadeou o surgimento de organismos resistentes. Pesquisadores identificaram microorganismos com genes *epsps* mutantes, incluindo a linhagem CP4 da bactéria de solo, *A. tumefasciensis*. Esse gene foi primeiramente inserido no cultivar transgênico *Roundup Ready*® pela empresa Monsanto. Desde seu lançamento, a área plantada com essa característica tem sido expandida em todo o mundo (James, 2014).

Os cultivares resistentes a insetos surgiram em resposta a outro importante desafio da agricultura, a destruição agrícola causada pelo ataque de insetos-praga. Os insetos são responsáveis pelos maiores danos causados à agricultura, resultando em perdas econômicas significativas (Oliveira et al., 2014). Diante dessa situação, a engenharia genética de plantas tem desenvolvido cultivares resistentes ao ataque de insetos-praga, através da introdução de genes exógenos no genoma da planta. A principal abordagem utiliza genes provenientes de *Bacillus thuringiensis (Bt),* por isso a tecnologia resultante é designada como *Bt*. Essa tecnologia tem sido utilizada com sucesso, visto que confere uma eficiente proteção ao hospedeiro, mesmo contra patógenos intracelulares.

Os primeiros resultados, da transferência de genes de *B. thuringiensis* foram obtidos experimentalmente em plantas de tabaco e tomate (Barton et al., 1987; Fischhoff et al., 1987). Desde então, a tecnologia *Bt* tem sido aplicada em outros cultivares agrícolas, visando o controle de insetos-praga. Em 1995, os primeiros cultivares transgênicos expressando as proteínas *Bt* foram aprovadas para

comercialização nos Estados Unidos, incluindo: o milho Maximizer™, expressando a proteína Cry1Ab, desenvolvido pela Novartis, o algodão Bollgard™, expressando a proteína Cr1Ac e a batata Newleaf™, expressando a proteína Cry3A, ambos produzidos pela Monsanto. No entanto, somente em 1996, os primeiros cultivares transgênicos foram plantados comercialmente nos Estados Unidos. Desde então, a área de plantio dessas culturas GM têm crescido substancialmente em todo o mundo. Atualmente, estima-se que a área plantada esteja em torno de 181 milhões de hectares (James, 2014).

## 1.1. PROTEÍNAS CRY

As proteínas Cry, também conhecidas como δ-endotoxinas, são produzidas pela bactéria de solo *Bacillus thuringiensis,* durante a fase de esporulação como cristais parasporais (Bravo et al., 2007). Diferentes cepas da bactéria produzem uma combinação de vários tipos de proteínas Cry, sendo cada uma delas seletivas para insetos de uma ordem específica (Clark et al., 2005). Algumas proteínas Cry não possuem atividade inseticida conhecida contra invertebrados, e por isso, tem sido denominadas de parasporinas (Palma et al., 2014). Nesse grupo estão inclusas as proteínas Cry31A, Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry 63A e Cry64A que embora não possuam atividade entomotóxica conhecida, estudos têm demonstrado que essas proteínas possuem uma significativa e específica atividade citotóxica contra células de câncer humano (Ohba et al.,2009). A Figura 1, apresenta, esquematicamente, alguns alvo das toxinas Cry.

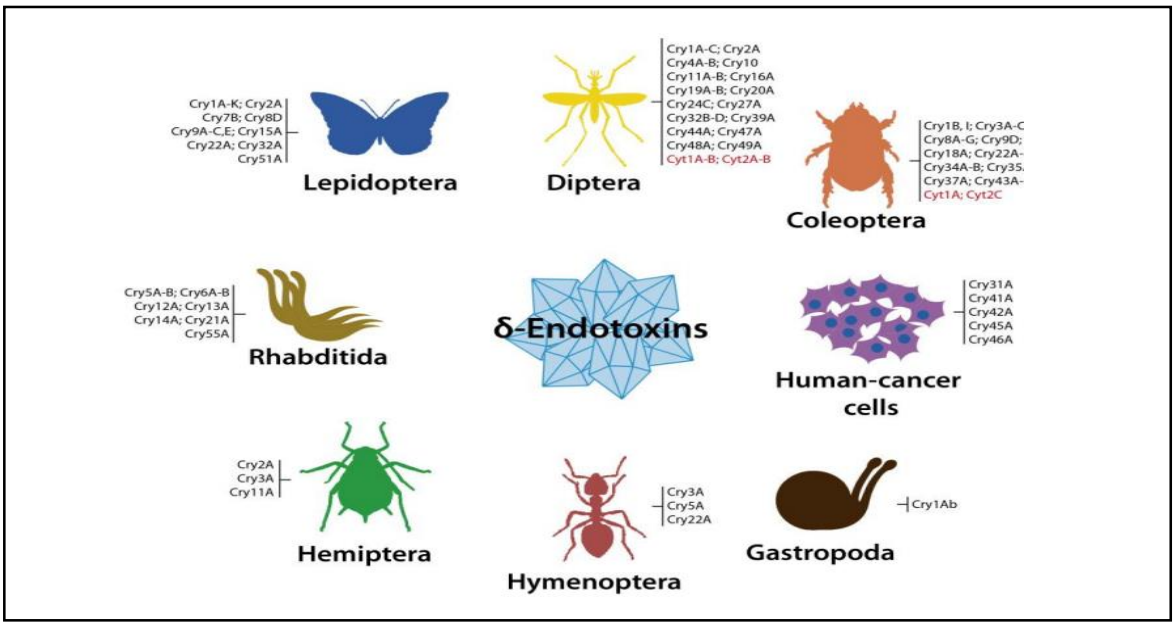



**FIGURA 1: Organismos susceptíveis a ação das δ-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis (Bt*).** Cry1 A-C (separado por hífen) indica um grupo de C3y1A, Cry1B e Cry1C. Cry 1B, I (separado por dois pontos) indica diferentes toxinas Cry1B e Cry1I. Toxinas Cyt (são também conhecidas como δ-endotoxinas), estão em vermelho. **Fonte**: Palma et al., 2014.

As propriedades inseticidas das toxinas *Bt* têm sido exploradas comercialmente, há mais de 60 anos (Federici, B.A, 2005). Preparações de esporos e cristais de *B. thuringiensis* têm sido utilizadas como biopesticidas para o controle de insetos-praga principalmente das ordens: lepidóptera, coleóptera e díptera. No entanto, há relatos de atividade inseticida também contra himenópteras (Garcia-Robles, et al., 2001) e nematoides (Marroquin et al., 2000; Wei et al., 2003).

O modo de ação das toxinas Cry nos insetos alvo, ainda não está completamente elucidada. Algumas hipóteses têm sido relatadas, incluindo, o modelo de formação de poros (Bravo et al., 2004) e o modelo de lise celular, desencadeado por transdução de sinais (Zhang et al., 2006). De um modo geral, a transformação das proteínas Cry, partindo da forma de protoxina inerte até a forma citotóxica ocorre através de vários passos. Inicialmente, os cristais são ingeridos por insetos

susceptíveis, no intestino são solubilizados, em seguida, a protoxina é clivada por proteases do hospedeiro, produzindo a toxina ativa. Esta, liga-se a receptores específicos, localizados na superfície epitelial da membrana peritrófica, desencadeando os processos de lise osmótica e/ou apoptose, resultando na eventual morte do hospedeiro.

No modelo proposto por Bravo et al., 2004, receptores específicos *caderin-like,* denominados de BT-$R_1$, e APN (aminopeptidase N) desempenham funções essenciais para a completa toxicidade da proteína Cry1A contra o inseto *Manduca sexta.* Após ativação, monômeros da toxina ligam-se ao receptor BT-$R_1$, em seguida, sofrem modificações conformacionais, mediada por proteases presentes na membrana. A toxina se oligomeriza para formar um pré poro tetramérico, que preferencialmente liga-se ao receptor APN. Após essa interação, o pré-poro é direcionado, para estruturas da membrana celular denominado de *lipid rafts*, que facilitam a inserção na membrana para formar o poro lítico. Esse poros formados, na membrana apical, resultam em rápidas alterações no potencial de membrana, no equilíbrio de íons, no influxo de água, no aumento do volume celular e na eventual lise.

O modelo lise celular desencadeado por transdução de sinais, descrito por Zhang et al.,2005 e Zhang et al., 2006, propõem uma hipótese independente da oligomerização da toxina. Nesses estudos, a toxina Cry1Ab liga-se ao seu receptor específico (BT-$R_1$) dando início a uma cascata de sinalização dependente de $Mg^{2+}$ (Zhang et al., 2005). Posteriormente, Zhang et al., 2006 demonstraram que a ligação da toxina ao receptor ativa uma via de sinalização, estimulada pela proteína G e a adenilato ciclase (AC), resultando em um aumento dos níveis de AMP cíclico e a subsequente ativação da proteína kinase A (PKA), levando a desestabilização do

citoesqueleto e dos canais iônicos, resultando em alterações citológicas sequenciais, que incluem a formação de poros na membrana, ausência de núcleos, inchaço celular e lise.

Um terceiro modelo tem sido proposto por Jurat-Fuentes, J.L e Adang, M.J, 2006, para explicar o modo de ação da toxina Cry1Ac no inseto *Heliothis virescens.* Nesse modelo, a toxina monomérica Cry1Ac liga-se a receptores semelhantes a caderina, denominados HevCaLP, resultando na ativação de uma via de sinalização intracelular regulada por fosfatases. Essa sinalização poderia ser dependente de uma interação direta entre a Cry1Ac e actina, uma proteína do citoesqueleto, que interage com o domínio citosólico das caderinas através da tirosina fosfatase, catenina e actinina (Jurat-Fuentes, J.L e Adang, M.J, 2006). Após ligação ao receptor HevCaLP, a toxina Cry1Ac se oligomeriza, e em seguida, liga-se a N-aminopeptidases (APN) ancoradas na membrana celular. Através dessas interações, os oligômeros da toxina Cry1Ac são direcionados para dentro da membrana, onde formam poros, resultando em um desequilíbrio osmótico e a subsequente ativação das vias de sinalização levando a morte celular (Jurat-Fuentes e Adang, 2006). Esse modelo sugere que a citotoxicidade é decorrente dos efeitos combinados da lise osmótica, decorrente da formação de poros na membrana e da sinalização celular. Assim, mecanismos propostos por Bravo et al., 2004 e Zhang et al., 2006 estariam incorporados. O modelo proposto por Jurat-Fuentes e Adang, 2006 ainda não é completamente aceito, visto que muitas etapas apresentadas são especulativas, necessitando portanto, ser confirmadas experimentalmente (Pigott e Ellar, 2007). A Figura 2 ilustra o três modelos propostos para o modo de ação das toxinas Cry nos insetos alvo.

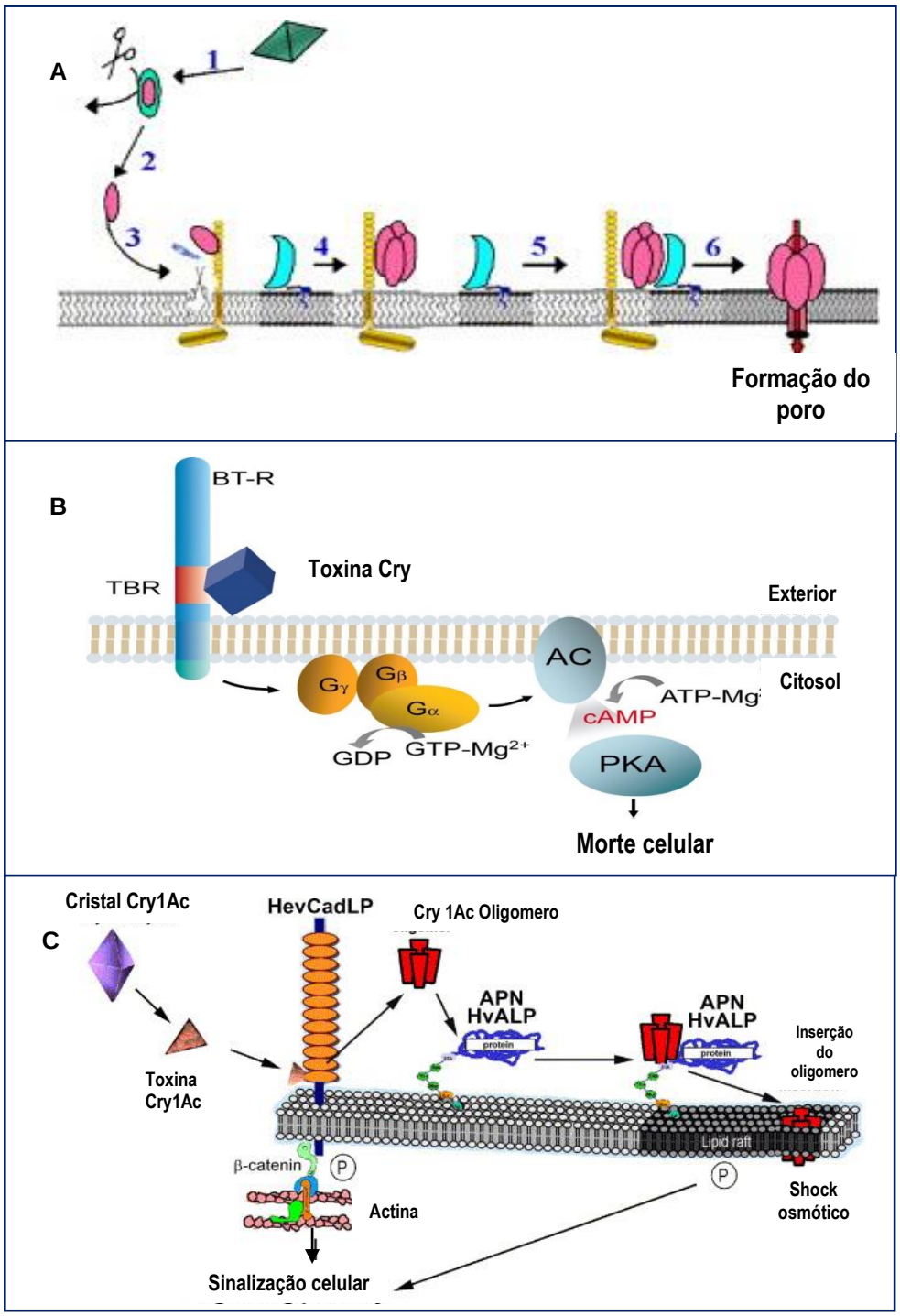



**FIGURA 2: Modelos proposto para o mecanismo de ação das toxinas Cry em insetos alvo. (A)** Modelo proposto por Bravo et al., 2004. 1- solubilização dos cristais, 2- clivagem proteolítica da protoxina, 3- ligação da toxina monomérica com o receptor Bt-$R_1$ , 4- Oligomerização das subunidades da toxina e formação da estrutura pré-poro, 5- ligação do oligômero ao receptor APN e mobilização para lipid rafts, 6- formação do poro lítico. **(B)** Modelo proposto por Zhang et al., 2006. A toxina Cry liga-se ao receptor BT-$R_1$, estimulando a proteína G e a adenilato ciclase (AC), os quais promovem a ativação intracelular de AMPc, resultando na ativação da proteína kinase (PKA), desestabilizando o citoesqueleto e os canais iônicos, levando a morte celular. **(C)** Modelo proposto por Jurat-Fuente e Adang, 2006. A toxina Cry liga-se ao receptor HevCadLP, ativando a via de sinalização intracelular regulada por fosfatases (P). A toxina após ligação ao receptor é processada e forma oligômeros que ligam-se a proteínas-GPI (APN ou HvALP), essas proteínas estão presentes nas estruturas lipid rafts, que favorecem a formação do poro lítico. Tanto a sinalização intracelular, que ativa a apoptose quanto a lise osmótica, induzida pela formação do poro, contribuem para a morte celular. **Fonte: Figura adaptada de Bravo et al., 2004; Zhang et al., 2006 e Jurat-Fuente e Adang, 2006.**

Os principais cultivares Bt disponibilizam a toxina Cry para os insetos alvo na sua forma ativa, não havendo necessidade das etapas de solubilização e ativação proteolítica (Clarck et al., 2005). Assim, após a ingestão, as toxinas ligam-se ao receptores específicos, encontrados na membrana peritrófica dos insetos, desencadeando a formação de poros e/ou a ativação da via de sinalização intracelular. Em ambos os modelos de ação, ocorre um importante comprometimento da membrana epitelial intestinal, resultando na morte do inseto.

Novas cepas de *B. thuringiensis* têm sido isoladas e caracterizadas visando, encontrar toxinas com novas propriedades inseticidas e/ou farmacológicas (Pigott e Ellar, 2007). Centenas de cepas foram investigadas e atualmente, cento e quarenta e três toxinas Cry, têm sido catalogadas, de acordo com o sitio de nomenclatura das toxinas provenientes de *B. thuringiensis* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil Crickmore/Bt/). Essa notável diversidade está relacionada a plasticidade genética desses organismos. Muitos genes *cry* estão associados com elementos de transposons que podem facilitar a amplificação genica, levando a evolução de novas toxinas (Maagd, R.A; Bravo, A; Crikmore, N, 2001). Além disso, muitos genes *cry* são encontrados nos plasmídeos e a transferência horizontal, através da conjugação, poderia resultar na criação de novas cepas contendo um novo complemento para esses genes (Thomas et al., 2000; Thomas et al.,2001).

A grande quantidade de sequencias depositadas em bancos de dados, tem permitido, através de alinhamentos, elucidar aspectos estruturais importantes para a função e a especificidade das toxinas Cry em insetos alvo (Pigott, C.R e Ellar,D.J, 2007). Höfte, H e Whiteley,R, 1989 realizaram as primeiras análises detalhadas, de algumas sequencias das proteínas Cry. Os resultados apresentaram elevado grau de diversidade entre as proteínas, no entanto, cinco blocos de aminoácidos eram

conservados. O sequenciamento de novas proteínas Cry possibilitou ampliar essas análises. Maagd et al., 2001, analisaram 31 sequencias dessas proteínas (Cry1-Cry31), e os resultados demonstraram que muitas proteínas Cry possuem algumas ou todas as cinco regiões conservadas, identificadas por Höfte, H e Whiteley, R,1989. Esses resultados sugerem que essas regiões são importantes para a estabilidade ou para a função das toxinas (Pigott,C.R e Ellar,D.J, 2007). As estruturas tridimensionais das toxinas Cry1, Cry2 e Cry3, resolvidas por cristalografia, demonstraram notável similaridade, sendo todas essas toxinas constituídas por três domínios (Figura 3). O N- terminal do domínio I, consiste de sete α-hélices e está envolvido na inserção da toxina na membrana e na formação do poro. O domínio II, apresenta simetria tripla, constituída por três folhas β. O C-terminal do domínio III, consiste de duas folhas β-antiparalelas). O domínio II e III estão envolvidos no reconhecido ao receptor e na posterior ligação (Maagd et al., 2001).

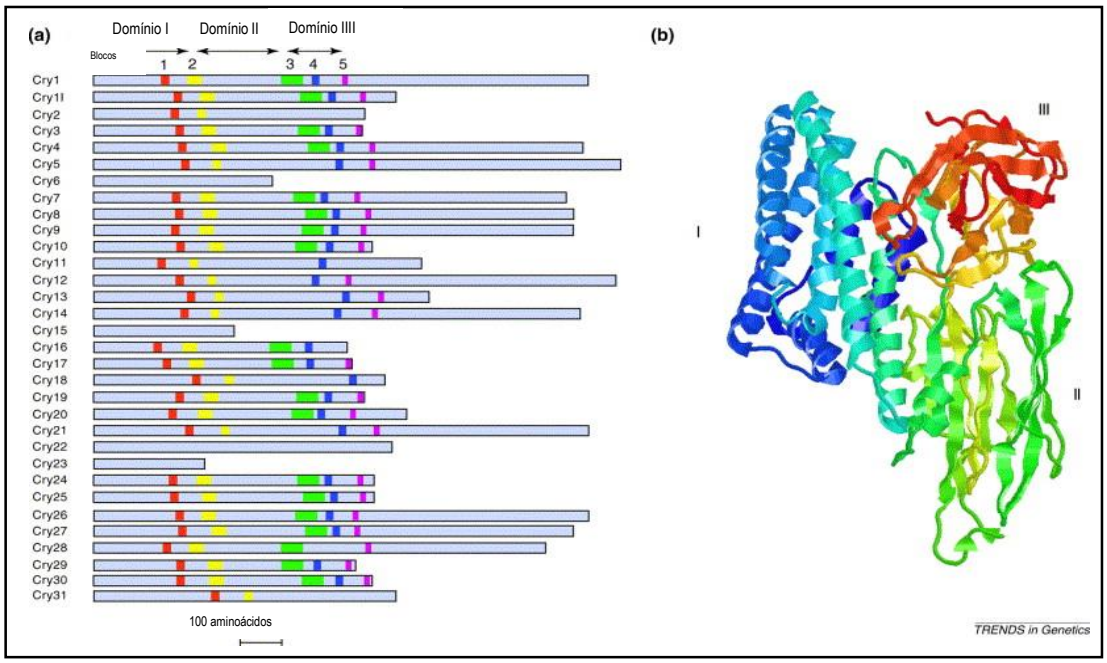



**FIGURA 3 Estrutura primária e terciária das toxinas Cry**. (a) tamanho relativo das protoxinas e posição das regiões conservadas**.** A posição dos três domínios (I, II e III) está indicada para a toxina ativada Cry1. A protoxina consiste em um pequeno fragmento na região N-terminal (20-40 aminoácidos) que antecede o domínio I e outro fragmento localizado na região C-terminal após o domínio III, nas protoxinas longas. (b) estrutura tridimensional da proteína ativada Cry1. A toxina apresenta os três domínios estruturais. Domínio I (em azul), domínio II (em verde) e domínio III ( em laranja). **Fonte:** Maagd et al., 2001 com modificações.

### 1.1.1. Proteína Cry 1Ac

A proteína Cry1Ac é produzida por *B. thuringiensis ssp. kurstaki* HD-73, na forma de uma protoxina, com aproximadamente, 133 kDa. Após ingestão, no intestino dos insetos alvo, a proteína é clivada por proteases específicas resultando na sua forma ativa, com aproximadamente 66 kDa (Höfte, H e Whiteley,R, 1989). Essa proteína tem se destacado dentre os membros da família das *Bt* δ-endotoxinas devido a elucidação da sua estrutura tridimensional e dos principais mecanismos moleculares envolvidos na sua ação contra insetos alvo. Além disso, também foi a primeira proteína Cry a ser expresso no algodão GM, o cultivar Bollgard I™, produzido pela empresa Monsanto, através da transformação genética do algodão, utilizando o vetor recombinante, contendo o gene sintético completo *cry1Ac,* esse sob expressão regulada pelo promotor constitutivo 35S (Perlak et al., 2001). Sua comercialização foi iniciada nos Estados Unidos, em 1996, e desde então, outros eventos transgênicos que expressam a proteína Cry1Ac, têm sido comercializados internacionalmente, destacando-se, a soja Intacta RR2 PRO e o algodão, Bollgard I™ e Bollgard II™, todos produzidos pelo Monsanto e o algodão, Widestriske™, produzido pela Dow Agrosciences. Todos esses cultivares aprovados e liberados para plantio no Brasil.

Esses cultivares têm contribuído para o aumento da produtividade agrícola, principalmente do algodão, visto que tem reduzido significativamente, os prejuízos causados pelo ataque dos principais insetos-praga da cotonicultura mundial, incluindo: *Helionthis virescens conhecida como lagarta da maça*, *Helicorverpa zea (lagarta do cartucho)* e *Pectinophora gossypiella (lagarta rosada)* (Perlak et al., 2001). No entanto, esse cultivares não tem demonstrado eficiência para o controle da principal praga da cotonicultura brasileira, causada pelo inseto, da ordem coleóptera, *Anthonomus grandis* (Coleoptera:Curculionidae), conhecido popularmente como bicudo-do-

algodoeiro. Por isso pesquisadores brasileiros têm investigado novas cepas de *B. thuringiensis* em busca de novas proteínas Cry com atividade entomotóxica contra esse coleóptera.

### 1.1.3. Proteína Cry8Ka5

Um novo gene, proveniente de *B. thuringiensis,* classificado como *cry8ka1* foi isolado por Grossi-de-Sá et al., 2009. A proteína recombinante, expressa em *Escherichia coli*, apresentou efeito inseticida moderado contra larvas do bicudo. No entanto, Oliveira et al., 2011 através das técnicas combinadas de DNA *shuffling* e *phage display,* obtiveram uma toxina Cry mutante, com significativa atividade entomotóxica contra larvas do bicudo do algodoeiro. Essa toxina foi classificada como Cry8Ka5. Análises *in silico* confirmaram a presença das principais estruturas constituintes, conservadas entre as toxinas Cry. Apesar das alterações observadas, em seis resíduos de aminoácidos distribuídos nos três domínios característicos das toxinas Cry, essas mudanças não alteraram a estabilidade e nem a função da toxina (Oliveira et al., 2011) (Figura 4). Além disso, avaliações preliminares de biossegurança alimentar, demonstraram que a toxina mutante não apresenta nenhum risco para o consumo humano e animal (Farias et al., 2015). Por isso, o gene *cry8ka5* tem sido utilizado em nosso laboratório, como ferramenta biotecnológica para a geração de plantas de algodão GM resistente ao bicudo do algodoeiro.

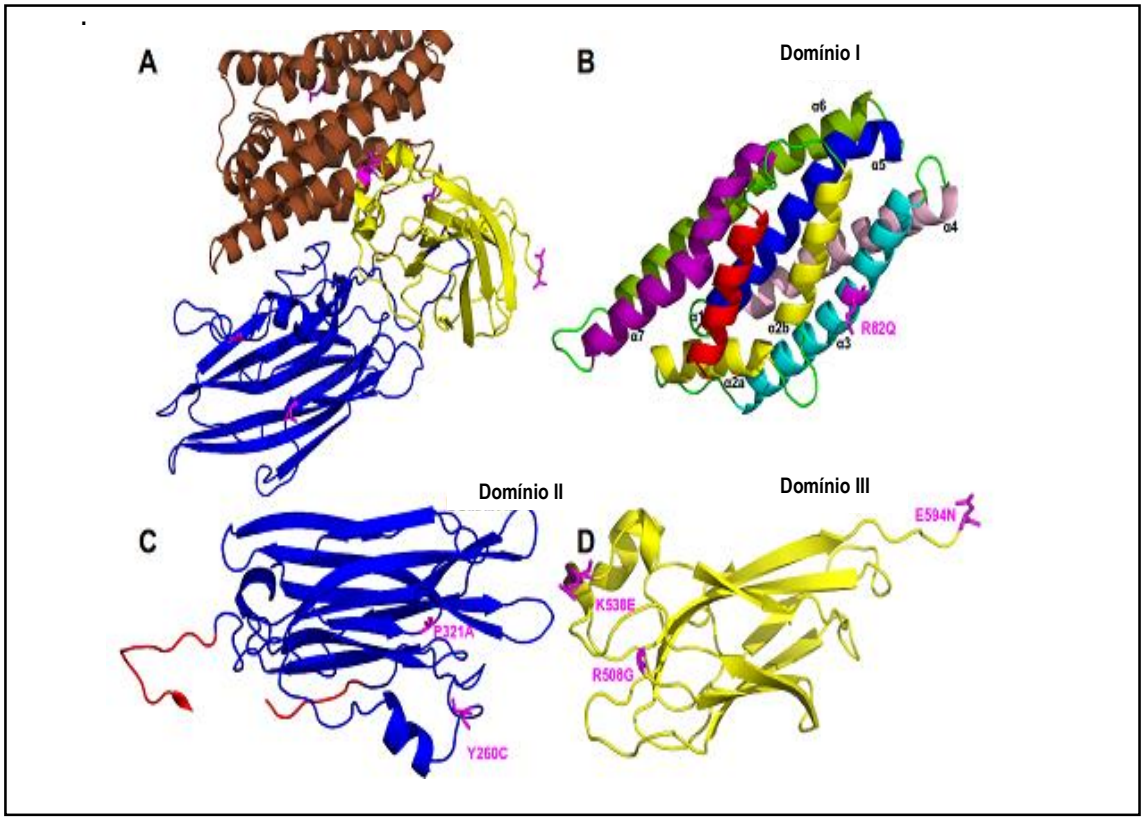



**FIGURA 4: Modelo estrutural da proteína Cry8Ka1 e as indicações das posições dos aminoácidos substituídos na toxina mutante Cry8Ka5**. **(A**)- Os três domínios da toxina Cry8Ka1 (Domínio I em marrom, o domínio II em azul e o domínio III, em amarelo. **(B)** domínio I constituído por oito α-hélices. A posição da substituição (R82Q) está localizada na hélice α3. **(C)** as folhas β-antiparalelas do domínio II, indicando os dois resíduos substituídos na toxina Cry8Ka5 (Cys e Ala, nas posições 260 e 321, respectivamente. **(D)** as folhas β do domínio III e os três outros resíduos substituídos, Gly, na posição 508, Glu, na posição 538 e Asp em 594. **Fonte**: Oliveira et al.,2011 com modificações.

## 1.2. IMPORTÂNCIA DOS CULTIVARES GM PARA A AGRICULTURA BRASILEIRA.

O agronegócio pode ser definido como sendo toda relação comercial e industrial envolvendo a cadeia produtiva agrícola ou pecuária de um país. No Brasil, o agronegócio é um setor estratégico para a economia, pois é um importante gerador de divisas. Atualmente, contribuí com aproximadamente, 40% do faturamento das exportações brasileiras sendo, atualmente, o principal responsável pelos superávits comerciais do país (Cepea, 2014).

O Brasil ocupa a segunda posição mundial no plantio de culturas GM, com uma área de 42,2 milhões de hectares (James, 2014), (Figura 5). Praticamente toda a produção das commodities agrícolas do país: soja, milho e o algodão, são provenientes de cultivares transgênicos (James, 2014). As previsões do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA) indicaram que na safra 2014/2015, a área plantada desses cultivares foram de 92% para a soja, 90% para o milho, e 65% para o algodão (Céleres, 2014).

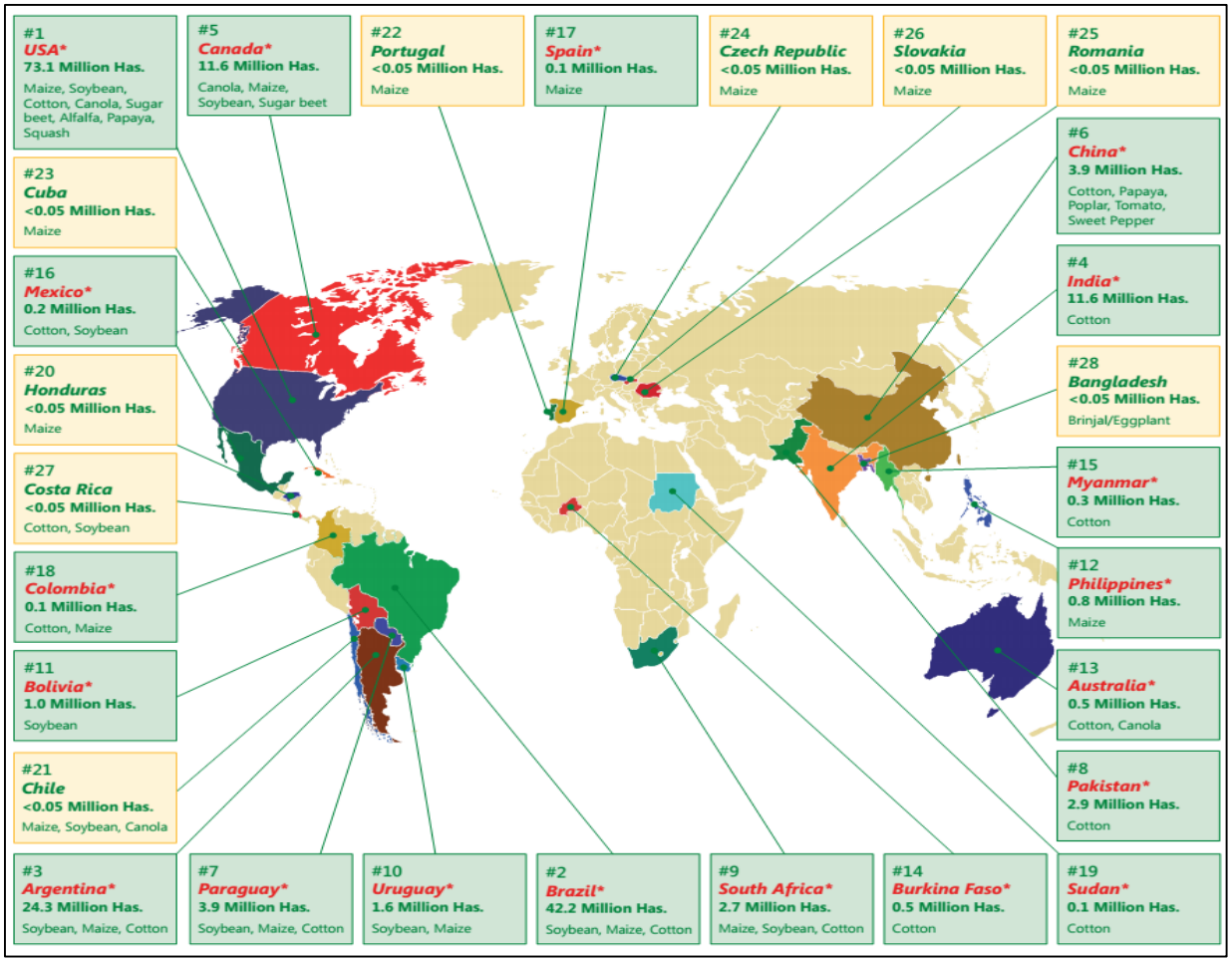



**FIGURA 5: Mapa global dos cultivares transgênicos comercializados em 2014.** ***Fonte:*** James, 2014 com modificações.

A utilização de cultivares GM tem contribuído significativamente para o aumento da produtividade agrícola no país. Em 2014, essa produção atingiu 195

milhões de toneladas e as estimativas, para 2015, são de mais uma safra recorde. A previsão é de crescimento de 6,6%, em comparação à safra anterior, ou seja, 206,34 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Sendo a soja, o milho e o algodão as propulsoras para ampliar a participação da agricultura nas exportações do brasileiras. Com safras estimadas em 194,31 milhões de toneladas, essas culturas corresponderão a 94,17% de toda a produção agrícola nacional.

## 1.3. CONTAMINAÇÃO DOS PRODUTOS AGRÍCOLA POR AFLATOXINAS

Apesar do crescente aumento na produção agrícola, a ausência de uma infra-estrutura logística eficiente para escoar toda a produção, tem aumentado o tempo de armazenamento pós-colheita. Essa etapa é essencial na cadeia produtiva agrícola, para determinar a qualidade final do produto. O tempo de armazenagem e as condições climáticas do país, têm favorecido o aumento na contaminação desses grãos por fungos produtores de toxinas. Dentre as principais micotoxinas, destacam-se as aflatoxinas, que são metabólitos secundários produzidos principalmente pelo fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus (*Amaike,S e Keller, N.P, 2011*).* Esses fungos contaminam uma ampla variedade de grãos, por isso, as aflatoxinas são consideradas contaminantes tóxicos inevitáveis em alimentos. Estima-se que, aproximadamente 25% de toda a produção agrícola mundial seja anualmente contaminada por aflatoxinas (Bley N' dede et al., 2012).

As aflatoxinas naturalmente encontrada em alimentos são: $AFB_1$ e $AFB_2$, produzidas pelo fungo *A. flavus* e $AFG_1$ e $AFG_2$, produzidas por *A.flavus* e *A. parasiticus.* A $AFB_1$ é a mais comumente encontrada e a que apresenta maior toxicidade (Jiang et al., 2003). A ingestão de alimentos contaminados com essa toxina,

principalmente por animais produtores de leite, resulta em uma forma hidroxilada, denominada de AFM1. Essa toxina liga-se covalentemente a caseína, contaminando o leite e produtos derivados (Maneta, A.C, 2011).

A Agência Internacional para pesquisa contra o câncer (IARC) tem classificado as aflatoxinas $AFB_1$ e $AFM_1$ como agentes carcinogênicos, pertencentes ao grupo I, para humanos (IARC, 2002). Por essa razão a presença desses contaminantes em alimentos é prejudicial para a saúde humana e animal. Outro agravante é a estabilidade química desses compostos, o que dificulta a sua completa eliminação, mesmo após processos de beneficiamento. Na tentativa de proteger os consumidores, diversos países têm estabelecido limites de concentração máxima para essas substâncias em alimentos. Na União Europeia, os níveis estabelecidos para $AFB_1$ é de 2µg/Kg. No Brasil, as legislações permitem a concentração de aflatoxinas ($AFB_1$+ $AFB_2$+$AFG_1$+$AFG_2$) em até 5 µg/kg (ANVISA, 2011).

## 1.4. MÉTODOS IMUNOQUIMICOS PARA A DETECÇÃO DE CULTIVARES GM E DE AFLATOXINAS EM PRODUTOS AGROPECUÁRIOS.

As previsões de crescimento da produção agrícola brasileira têm proporcionado ao agronegócio, ampliar sua participação na economia do país. Isso tem lançado novos desafios, principalmente, quanto à adequação dos produtos agropecuários às legislações internacionais. A comprovação de origem e de segurança alimentar tem sido um dos gargalos para essa expansão. Atualmente, a identificação dos produtos provenientes de cultivares GM é realizada, através dos métodos moleculares de PCR e RT-PCR. Por outro lado, para a certificação dos produtos, quanto à presença de aflatoxinas, os métodos rotineiramente utilizados, incluem as técnicas de HPLC e

espectrometria de massa. Embora, sejam métodos sensíveis e acurados, apresentam como principal desvantagem, o elevado custo operacional. Necessitando de pessoas especializadas para a manipulação e interpretação dos resultados. Nesse contexto, as técnicas imunoquímicas têm sido utilizadas, como ferramentas analíticas alternativas para a certificação de produtos agropecuários, visto que, providenciam resultados, rápidos e com menor custo, quando comparado aos métodos convencionais. Os principais métodos imunoquímicos disponibilizados comercialmente, são os testes de ELISA e os de fluxo lateral. Ambos, baseiam-se na elevada especificidade das interações antígeno- anticorpo, que permitem um reconhecimento acurado de substancias antigênicas específicas mesmo na presença de compostos interferentes.

Para a detecção de aflatoxinas, os testes de ELISA e os de fluxo lateral utilizam o formato competitivo. No ensaio de ELISA, anticorpos específicos são imobilizados nos poços das placas de poliestireno e o reagente de detecção é constituído pelo antígeno conjugado com a enzima peroxidase (HRP). Para a detecção e quantificação, o reagente é misturado à amostra e em seguida, adicionado aos anticorpos imobilizados. Na ausência de aflatoxinas, o resultado é caracterizado pelo desenvolvimento colorimétrico, após adição do substrato cromogênico. Na presença dessas toxinas, ocorre redução da intensidade colorimétrica, em decorrência da competição com o conjugado pelos anticorpos imobilizados.

Para a detecção dos cultivares GM, os principais testes de ELISA disponíveis comercialmente, têm especificidade pelo marcador gênico, neomicina fosfotransferase II (*nptII*), comumente utilizados na engenharia genética de plantas. Outro teste disponível é para a detecção das proteínas EPSPS e fosfinotricina acetiltransferase (PAT), ambas expressas em cultivares tolerantes a herbicidas e

finalmente, o teste disponível para a detecção da proteína Cry1Ab, presente em cultivares resistentes a insetos-praga (Anklam et al., 2002). Outros kits para uma ampla variedade de cultivares biotecnológicos têm sido avaliados e incluem as proteínas *Bt*: Cry1Ac, Cry 1C, Cry3A, Cry2A e Cry9C. A técnica de ELISA permite automatização das análises e consequentemente avaliação de amostras em escala industrial. No entanto, necessita de especialistas e de equipamentos para sua interpretação, além disso, não pode ser utilizada em testes em campo. Por isso, existe uma demanda pelos métodos imunoquímicos portáteis, visto que as análises poderiam ser realizadas em campo, sem há necessidade de uma infraestrutura laboratorial sofisticada.

As análises imunocromatográficas, também conhecidas como testes de fluxo lateral ou simplesmente fitas-testes, são ferramentas analíticas bem estabelecidas. Essa tecnologia oferece vantagens adicionais quando comparada aos métodos convencionais, incluindo: rapidez, simplicidade e baixo custo operacional. Por isso tem sido utilizada em diversos segmentos, incluindo: saúde animal (Laitinen e Vueton, 1996); segurança alimentar (Delmulle et al., 2005;); diagnósticos de desordens clínicas (Ahn et al.,2003; Barnett et al., 2004) e agricultura (Santos, et al., 2015).

### 1.4.1. Estrutura e princípios dos testes de fluxo lateral (TFLs)

As fitas testes convencionais são delimitada em áreas de análises distintas, sendo cada uma constituída por diferentes reagentes e/ou materiais. Essas áreas são denominadas respectivamente por: *sample pad*, *conjugate pad*, membrana de nitrocelulose e *absorbent pad* (Figure 6). Quando a análise é iniciada, a amostra entra em contato com o *sample pad* e migra, por capilaridade, dessa região para o *conjugate*

*pad.* Nessa região, anticorpos específicos foram previamente marcados com partículas colorimétricas ou fluoróforos, e em seguida imobilizados. Através do fluxo, as amostras interagem com os anticorpos, presentes nessa região, e ambos migram para a próxima área da fita, a matriz de reação, a membrana de nitrocelulose. Essa matriz é constituída por uma membrana porosa, no qual outros componentes da análise foram previamente imobilizados. Esses são fixados em áreas definidas como linha de resultado ou linha teste e linha controle. Esses componentes servem para capturar o anticorpo conjugado a medida que migram através dessas regiões. Os reagentes em excesso são retidos na região *absorbent pad*. Os resultados são interpretados através da reação da matriz quanto a presença ou ausência de linhas do conjugado capturado, nas região de teste e de controle.

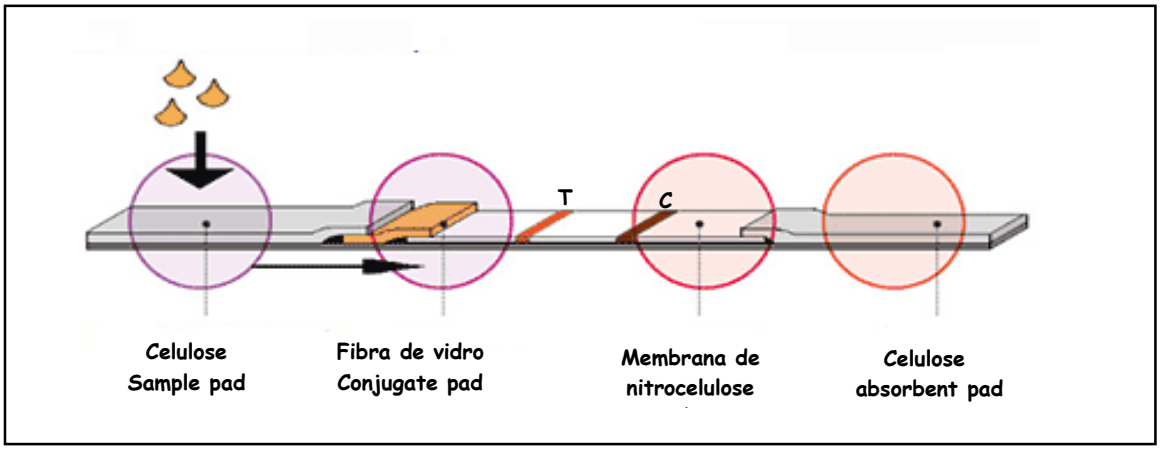



**FIGURA 6: Configuração típica de um teste de fluxo lateral**. *T= Linha teste ou linha de resultado. C= Linha controle.* **Fonte:** Farell, B.O, 2009 com adaptações

Dependendo das características da molécula alvo, o formato das análises dos testes de fluxo lateral pode ser: competitivo ou direto, também conhecido como *sandwich*. A análise direta é comumente utilizada quando a molécula de interesse possui múltiplos determinantes antigênicos. Nesse formato, dois anticorpos que reconhecem epitopos distintos da molécula alvo, são utilizados. O primeiro é conjugado com as partículas de detecção e desidratados no *conjugate pad*, servindo

como reagente de detecção. O outro anticorpo é imobilizado na linha teste na membrana de nitrocelulose e serve como reagente de captura. Um terceiro anticorpo, nesse caso, específico para a detecção do anticorpo conjugado é imobilizado na membrana de nitrocelulose e utilizado para produzir um sinal na linha controle. Quando a amostra é aplicada no *sample pad,* a solução migra, interage com os anticorpos, no *conjugate pad*, liberando o reagente de detecção. Em seguida, essa mistura interage com os anticorpos de captura. A resposta na linha teste é diretamente proporcional à concentração do antígeno na amostra. O excesso do conjugado será capturado por uma segunda linha de anticorpos imobilizados, na linha controle. Nesse caso, o resultado positivo é indicado pela presença de duas linhas vermelhas, uma situada na região teste e a outra na controle. (Figura 7).

O formato competitivo é utilizado quando a molécula alvo, possui um único determinante antigênico (Quian e Bau, 2004). Nesse formato, o antígeno é acoplado a uma proteína carreadora e o complexo imobilizado na membrana de nitrocelulose, na linha teste. Nesse sistema, o próprio antígeno funciona como reagente de captura para os anticorpos conjugados, concentrando-os e formando uma linha visível na região teste. O anticorpo imobilizado na linha controle captura o excesso e forma uma outra linha visível na região controle. A interpretação dos resultados, nesse sistema é contrário ao obtido no formato direto ou *sandwich*. Assim, uma única banda será observada na linha controle, quando na amostra analisada o antígeno estiver presente. Por outro lado, uma amostra negativa resultará na formação de duas linhas, uma na região teste e outra no controle (Figura 8).

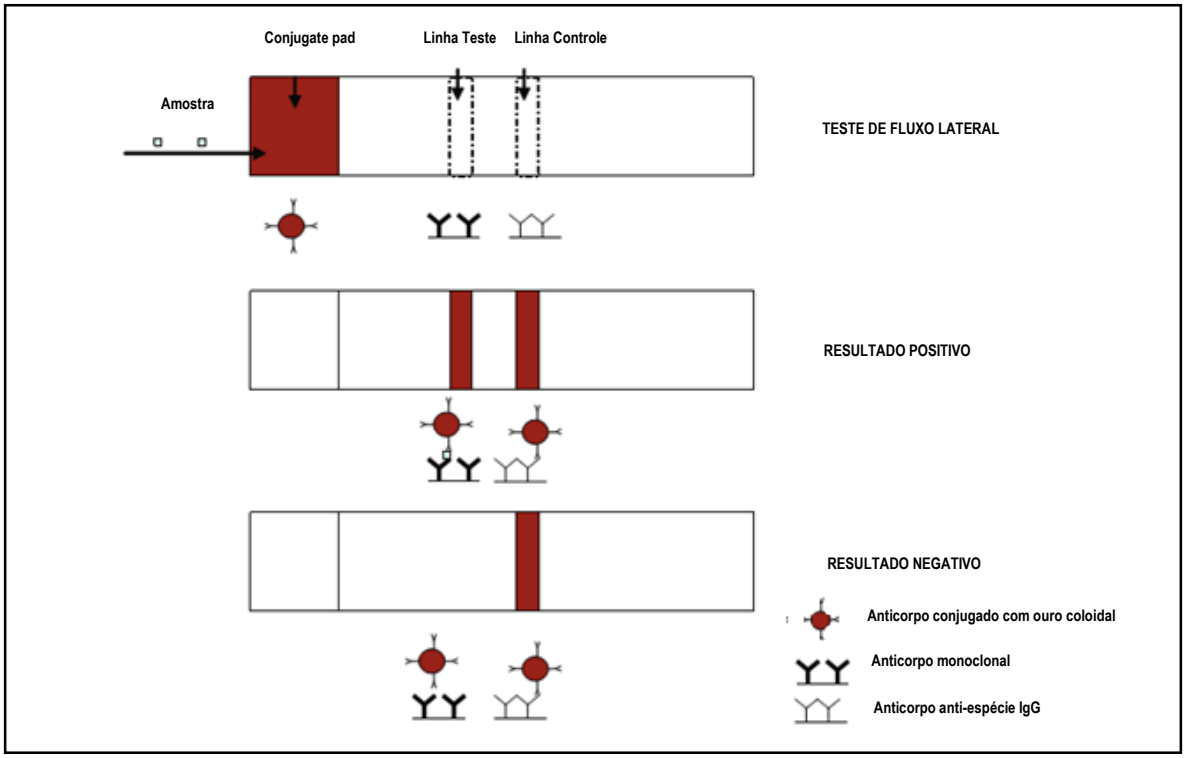



**FIGURA 7: Formato direto ou *"sandwich"* dos testes de fluxo lateral. Fonte**: Farell, B.O, 2009, com modificações

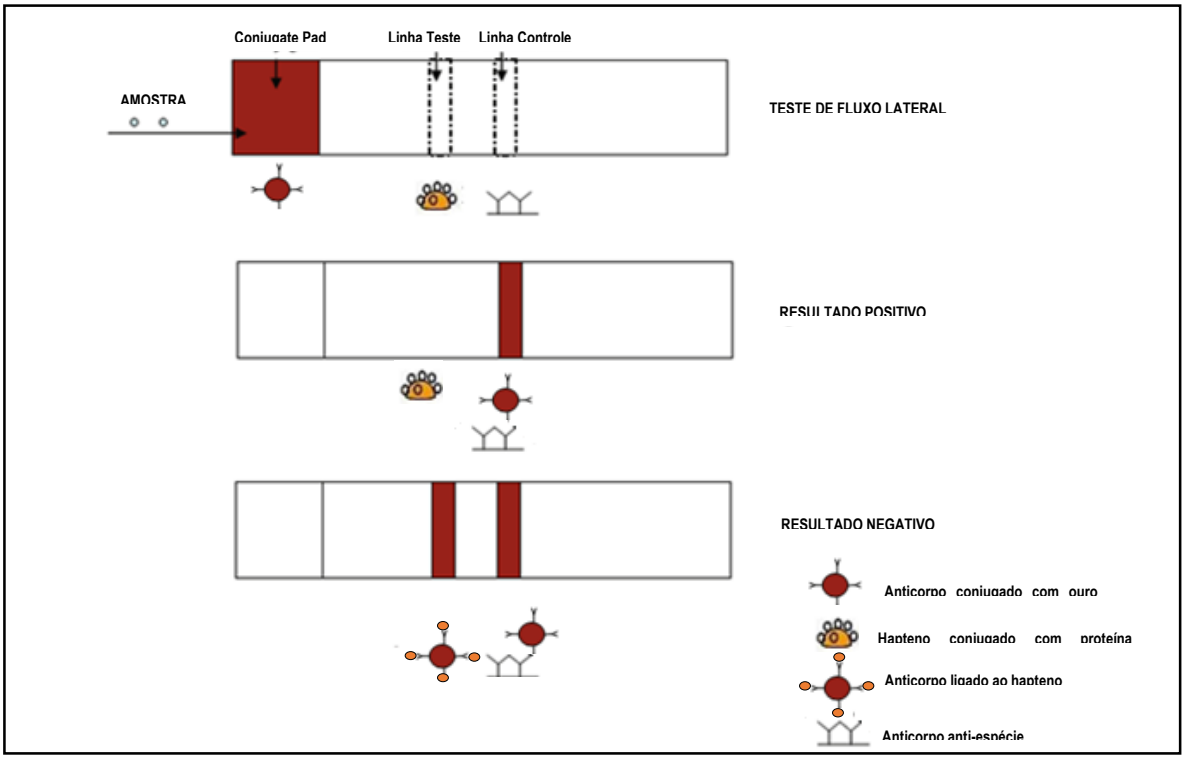



**FIGURA 8: Formato competitivo dos testes de fluxo lateral. Fonte:** Farell, B.O, 2009 com modificações

Além das inúmeras vantagens na utilização dos testes de fluxo lateral, que inclui: rapidez na obtenção dos resultados, especificidade, sensibilidade, estabilidade, fácil manuseio e menor custo operacional, essa tecnologia pode ainda ser empregada para análises de produtos em larga escala, através da associação com dispositivos eletrônicos, incluindo sistemas de leituras e sistemas de informação (Farell, B.O, 2009). Outra vantagem está relacionada a facilidade de escalonamento industrial, principalmente, devido à utilização de equipamentos de fácil manipulação e acessível economicamente, além disso, todas as etapas do processo já estão bem estabelecidas. Por isso, essa tecnologia tem sido utilizada para a detecção de uma ampla variedade de antígenos ou anticorpos. Recentemente, esses testes têm sido utilizados para a detecção de material genético. Esse método conhecido como, testes de fluxo lateral para ácidos nucléicos (NALFIA), é utilizado para identificar a presença de uma sequência de ácidos nucléicos dupla-fita específica para organismos alvo, principalmente, patógenos em alimentos (Posthuma-Trumpie, G.A; Korf, J e Van Amerongen, 2009).

### 1.4.2. Aplicações dos testes de fluxo lateral na agricultura

Devido à facilidade e a acurácia, os testes de fluxo lateral têm sido utilizado na rastreabilidade agrícola, principalmente na certificação de sementes e grãos GM e dos produtos derivados e, na avaliação da qualidade dos grãos e alimentos derivados, principalmente quanto a presença de micotoxinas.

A rastreabilidade é uma garantia dada ao consumidor de que um determinado produto e/ou alimento teve sua produção controlada em todas as fases da cadeia produtiva e portanto atende as exigências, quanto a segurança e qualidade. Os testes

de fluxo lateral têm sido rotineiramente utilizados em campo, nos diversos estágios da produção agrícola, desde a certificação das sementes antes do plantio, estendendo-se através da manipulação e processamento até o produto final (Figura 9). Esses testes são utilizados para detectar a presença ou ausência de um evento GM específico, adequando os produtos as legislações regulatórias em vigor. As fita testes também têm sido utilizadas para confirmar o status dos grãos (GM ou não GM) antes da entrega ao destinatário, como um requisito para a certificação do produto final. Visto que, a concentração das proteínas expressas em cultivares transgênicos pode ser afetada durante os processos de beneficiamento (Grothaus et al., 2006). Os testes de fluxo lateral também podem ser utilizados para assegurar a qualidade da matéria prima, quanto à adequação aos limites estabelecidos para a concentração de aflatoxinas em grãos e produtos derivados.

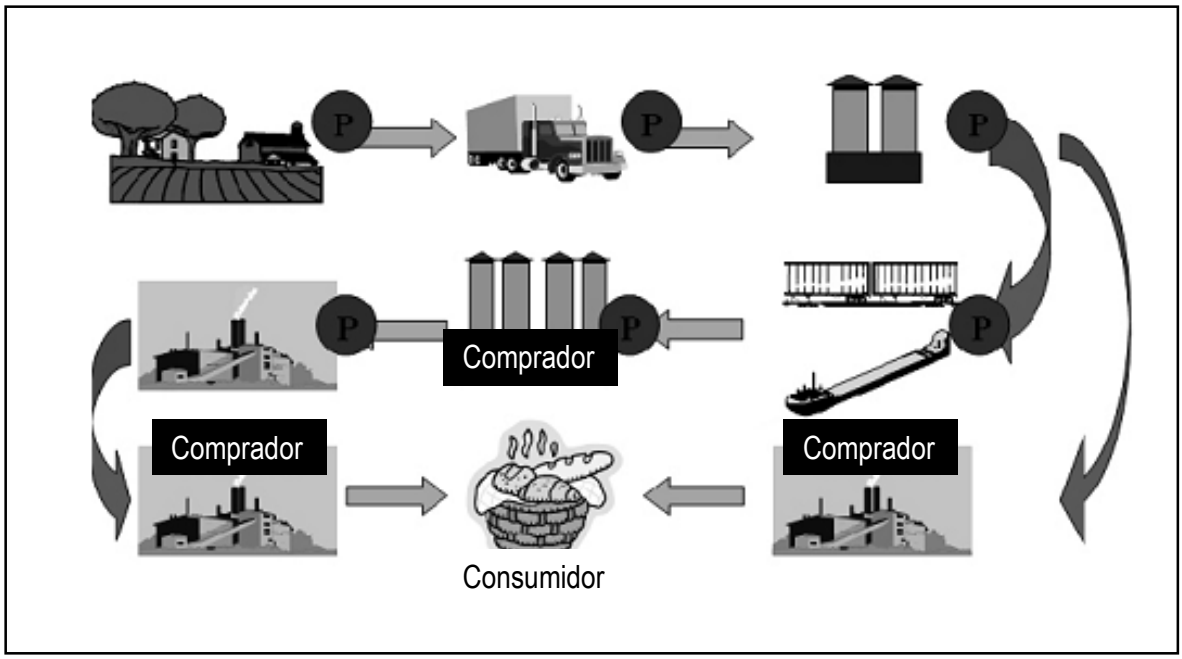



**FIGURA 9: Fluxograma da rastreabilidade agrícola.** P= pontos em potencial para utilização dos testes de fluxo lateral na cadeia produtiva. **Fonte:** Grothaus et al., 2006 com modificações.

Embora, existam testes de fluxo lateral disponíveis no mercado, todos são produzidos fora do país e atendem ao mercado brasileiro, através de importações, chegando ao agricultor com preços elevados. Isso dificulta a rastreabilidade agrícola do país, visto que onera significativamente a produção agropecuária. Visando atender a essa importante demanda nacional, o presente trabalho objetiva desenvolver testes de fluxo lateral para a certificação de cultivares GM e para a detecção de aflatoxinas em produtos agropecuários.

# 2. OBJETIVOS

## 2.1. OBJETIVO GERAL:

Desenvolver e validar kits de detecção, utilizando o sistema de testes de fluxo lateral, para a certificação de cultivares GM e para o monitoramento de aflatoxinas em produtos agropecuários.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Produzir e caracterizar os anticorpos monoclonais contra a proteína Cry1Ac e contra a aflatoxina $B_1$;
- Avaliar a reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais α-Cry1Ac e α-AFB1;
- Preparar os testes de fluxo lateral para a identificação das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5 e para a detecção de aflatoxinas em produtos agrícolas;
- Validar os testes desenvolvidos.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada para o desenvolvimento dos testes de detecção, seguiu o fluxograma indicado na Figura 10.

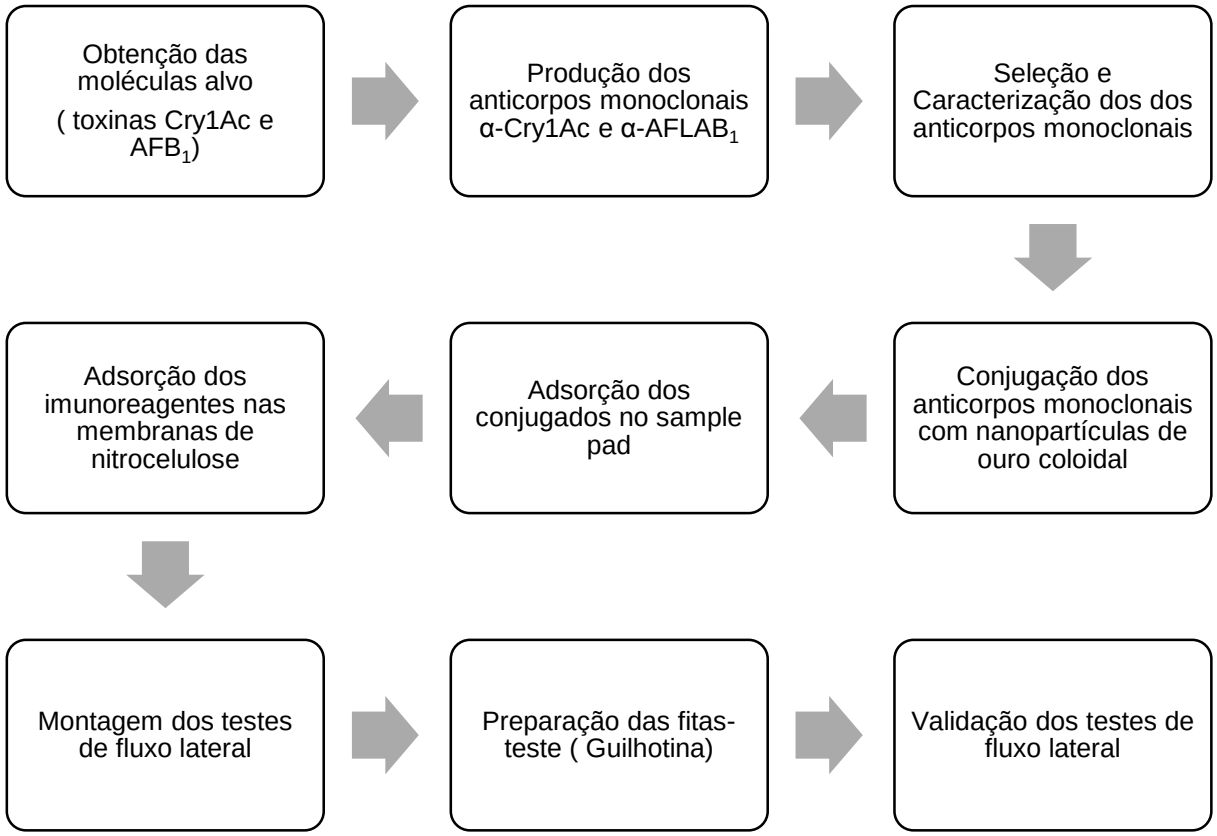



**FIGURA 10: Fluxograma da metodologia utilizada para a produção dos testes de fluxo lateral**

## 3.1. REAGENTES QUÍMICOS e MATERIAIS

As soluções padrões de $AFB_1$-BSA e $AFM_1$-BSA, o anticorpo anti-mouse IgG conjugado com HRP, os adjuvantes completo e incompleto de Freund´s, Ácido cloroáurico ($HAuCl_4.3H_2O$), polietileno glicol 4000 (PEG 4000), o agente de seleção HAT (hipoxantina- aminopterina- timidina), o substrato de revelação para ELISA ρ-nitrofenil fosfato e o kit de isotipagem para os anticorpos monoclonais foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina e HEPES, soro fetal bovino, os antibióticos penicilina, estreptomicina e o anticorpo anti-mouse IgG foram adquiridos da empresa Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). As colunas de afinidade HiTrap™ proteína G e HisTrap™ HP foram adquirida da empresa GE Healthcare (Uppsala, Sweden). O reagente de bloqueio para ELISA gelatin (blotting grade), o susbtrato de revelação TMB (4-amino-3,5-dimetilfenil-2,6-dimetilalanina) e o reagente para quantificação de proteínas foram adquiridos da empresa Bio Rad Laboratórios (Hercules, CA, USA). Os materiais para a produção das fitas testes: Membrana de Nitrocelulose High-Flow 120, papel filtro (sample pad e absorbent pad), fibra de vidro (conjugate pad) e o sistema Centricon YM-30 foram adquiridos da empresa Milipore (Bedford, MA, USA). Os equipamentos utilizados na produção das fitas testes: XYZ 3050 Biostrip Dispenser e CM4000 cutter foram adquiridas da Bio-Dot (Irvine, CA, USA). As placas de ELISA (High Binding Flat-bottomed) e as frascos para cultura celular de 25 $cm^3$ e 75 $cm^3$ foram adquiridas da empresa Corning (MA, USA). Todas as placas para a cultura de células foram adquiridas da empresa TPP (St. Louis, MO, USA). Kits comerciais de ELISA para a detecção de $AFB_1$ foram adquiridos da empresa r-Biopharma (Darmstadt, Germany).

## 3.2. MATERIAIS BIOLÓGICOS

### 3.2.1. Microorganismos

A linhagem transformada de *Escherichia coli* JM 103, contendo o plasmídeo recombinante pOS 4201 (Código ECE53), foi adquirido do BGSC (Bacillus Genetic Stock Center) da Universidade de Ohio, USA.

A linhagem transformada de *E.coli* BL21(DE3), contendo o plasmídeo recombinante Cry8Ka5PET101 foi obtida em nosso laboratório por Oliveira et al., 2011.

Cepas do fungo aflatoxigênico *Aspergillus flavus* foram cedidas pelo professor Dr. Edivaldo Ximenes, da Universidade de Brasília, DF

### 3.2.2. Linhagem Celular

A linhagem celular de mieloma murinho, Sp2/0-Ag14 foi doada pela Drª. Sandra Farias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### *3.2.3. Animais de laboratório*

Os camundongos da linhagem Balb/c foram adquiridos do Centro de criação de animais de laboratório- CECAL- FIOCRUZ- RJ. Esses animais foram mantidos no biotério do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB), em caixas de polipropileno, com substrato de raspas de pinho, água e ração *ad libitum*, com as seguintes condições ambientais: temperatura (23,0 ± 2,0 ºC), fotoperíodo (12h claro/12 h escuro)

e umidade do ar controlada (45-55%). O referido Biotério é o único de Brasília/DF com registro no COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), e obedece a lei 11.794/2008 que regula o uso de animais em pesquisas científicas.

### *3.2.4.* Plantas de algodão e grãos de soja

Todas as plantas de algodão utilizadas nos experimentos de validação dos testes de fluxo lateral: (Cooker 312, Bollgard I™ e Embrapa- Planta 50 e 217), foram mantidas em casas de vegetação, na EMBRAPA- Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/DF.

Grãos de soja da linhagem BR-16 (não GM) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho, pesquisador da EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/DF.

## 3.3. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Cry 1AC e Cry8Ka5

A expressão da proteína Cry1Ac foi realizada em *E.coli* JM 103, previamente transformada com o plasmídeo recombinante pKK223-3 (Amershan) (Figura 11 A), contendo o gene cry1Ac proveniente de *Bacillus thuringiensis*, var. *hurstaki* (HD73) (Ge, A.Z; Pfister, R. M e Dean, D.H et al., 1990). As células foram crescidas em meio líquido LB contendo ampicilina (1µg/mL) a temperatura de 37ºC, sob agitação constante de 200 rpm. Para induzir a expressão, 1mM IPTG foi adicionado a cultura quando a $OD_{600}$ atingiu entre 0.8-1. Após 48 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação (4.500 x g durante 20 minutos, 10ºC). O precipitado foi

solubilizado em tampão de lise (50 mM Tris-HCL, 50 mM EDTA, 15% sacarose e 2 mg lisozima, pH 8.0) na proporção de 50 mL/L de expressão) mantido a 4ºC durante 18h. Após incubação, as células foram lisadas, através de ultra-som (sonicador), utilizando 5 ciclos de 70 s com amplitude de 70%. Em seguida, a suspensão foi tratada com 1mL de tripsina (1mg/mL) na proporção de 1:200 (v/v), e mantida a 37ºC. Após 1 hora, a suspensão foi centrifugada (10.000 x g, durante 15 minutos a 4ºC). O precipitado lavado e centrifugado (10.000 x g durante 30 min, a 4ºC) três vezes com 30 mL da solução: 50 mM NaCl, contendo 0,2% Triton X-100, cinco vezes com 0,5 M NaCl e duas vezes com água deionizada. Os corpos de inclusão, contendo a proteína CryAc, foram solubilizados em tampão contendo 10 mM DTT e 50 mM carbonato de sódio, pH 10, durante 2 h a 37ºC. Esse material foi dialisado, contra o tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8.0, 18 h a 4ºC, utilizando membranas de diálise com poros de exclusão de 8-12 kDa. Uma alíquota foi retirada e analisadas em gel de poliacrilamida 12%, sob condições desnaturantes. A concentração de proteínas totais foi estimada pelo método de Bradford, 1976. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão proteolítica, utilizando a enzima tripsina, na proporção de 1:50 (*m/m*) durante 4 h a 37ºC. A reação foi finalizada após adição de 1M PMSF. A solução foi novamente submetida a diálise, utilizando membranas com poros de exclusão de 6-8 kDa contra o tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8.0, 12-16 h, a 4ºC. Em seguida, a amostra foi concentrada, utilizando o sistema Centricon YM-30 (com limite de exclusão de 30 kDa), conforme instruções do fabricante. Posteriormente quantificadas pelo método de Bradford e analisadas, sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 12%.

A proteína Cry8Ka5 foi obtida a partir da expressão heteróloga em *E.coli* BL21(DE3), contendo o gene mutante *cry8ka5* inserido no plasmídeo pET101/D Topo (Invitrogen) (Figura 11B), como descrito por Oliveira, 2008. As células foram crescidas

em meio líquido LB contendo ampicilina (1µg/mL) a temperatura de 37ºC, sob agitação constante de 200 rpm. Para induzir a expressão, 1mM IPTG foi adicionado a cultura quando a OD $_{600}$ atingiu entre 0.8-1. Após 12 h de indução, as células foram coletadas por centrifugação (4.500 x g, durante 20 minutos a 10ºC). O precipitado foi solubilizado em tampão de lise e mantido durante 18 h a 4ºC. A suspensão foi submetida à sonicação em gelo (3 ciclos de 60 s com amplitude de 70%) e em seguida centrifugada (12.500 x g durante 15 minutos a 4ºC). O sobrenadante foi coletado e uma alíquota utilizada para análise em gel de poliacrilamida 12%, sob condições desnaturantes. O sobrendante proveniente da expressão foi submetido à cromatografia de afinidade, utilizando a coluna HisTrap™, de acordo com as instruções do fabricante. A proteína Cry8Ka5 foi obtida após eluição com 300 mM de imidazol e em seguida, submetida a dialise contra o tampão fosfato de sódio, pH 8,0 em membrana com poros de exclusão de 6- 8kDa. A amostra foi concentrada e quantificada conforme descrito anteriormente.

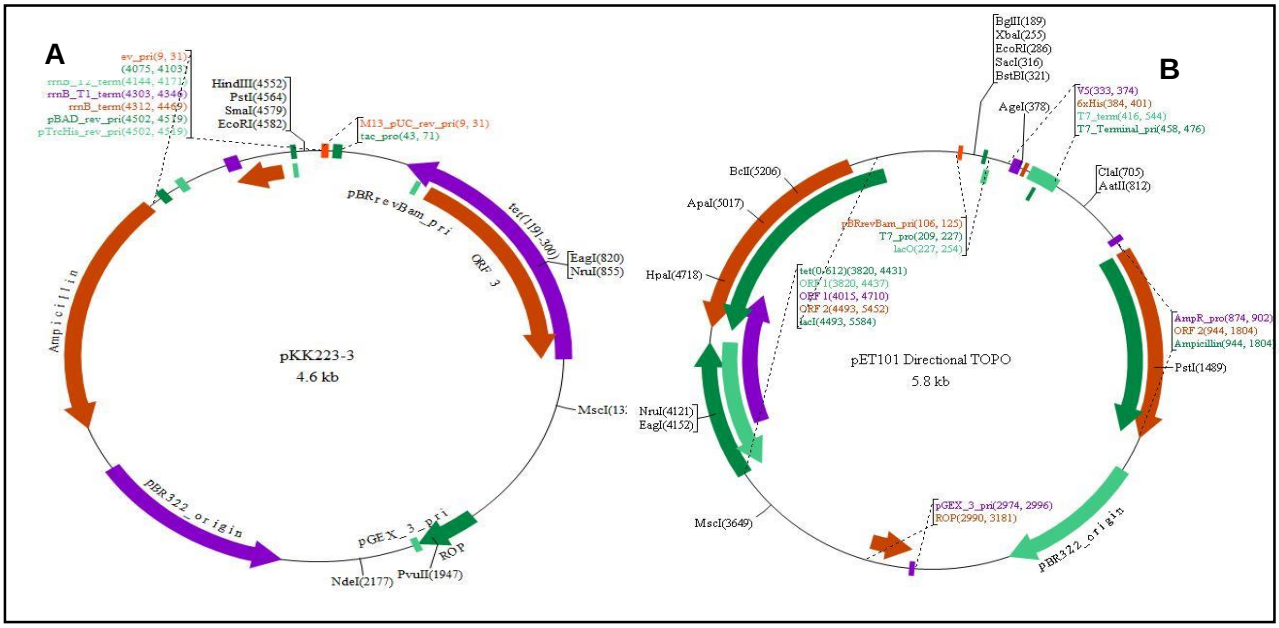



**FIGURA 11: Representação dos vetores utilizados para a expressão heteróloga em *E.coli.*** A- vetor comercial pKK223-3 (Amershan, GE Healthcare). B- vetor comercial pET101/D- TOPO (Invitrogen)

### 3.4. PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-Cry1AC e ANTI-AFB$_1$

Os anticorpos monoclonais foram obtidos a partir da imunização dos camundongos, com os respectivos antígenos, seguido pelas etapas de: fusão celular, para obtenção dos hibridomas, expansão e seleção, clonagem dos hibridomas estáveis, produção *in vivo* dos anticorpos monoclonais, através da técnica de ascite. A metodologia empregada para obtenção dos anticorpos monoclonais está demonstrado na Figura 12.

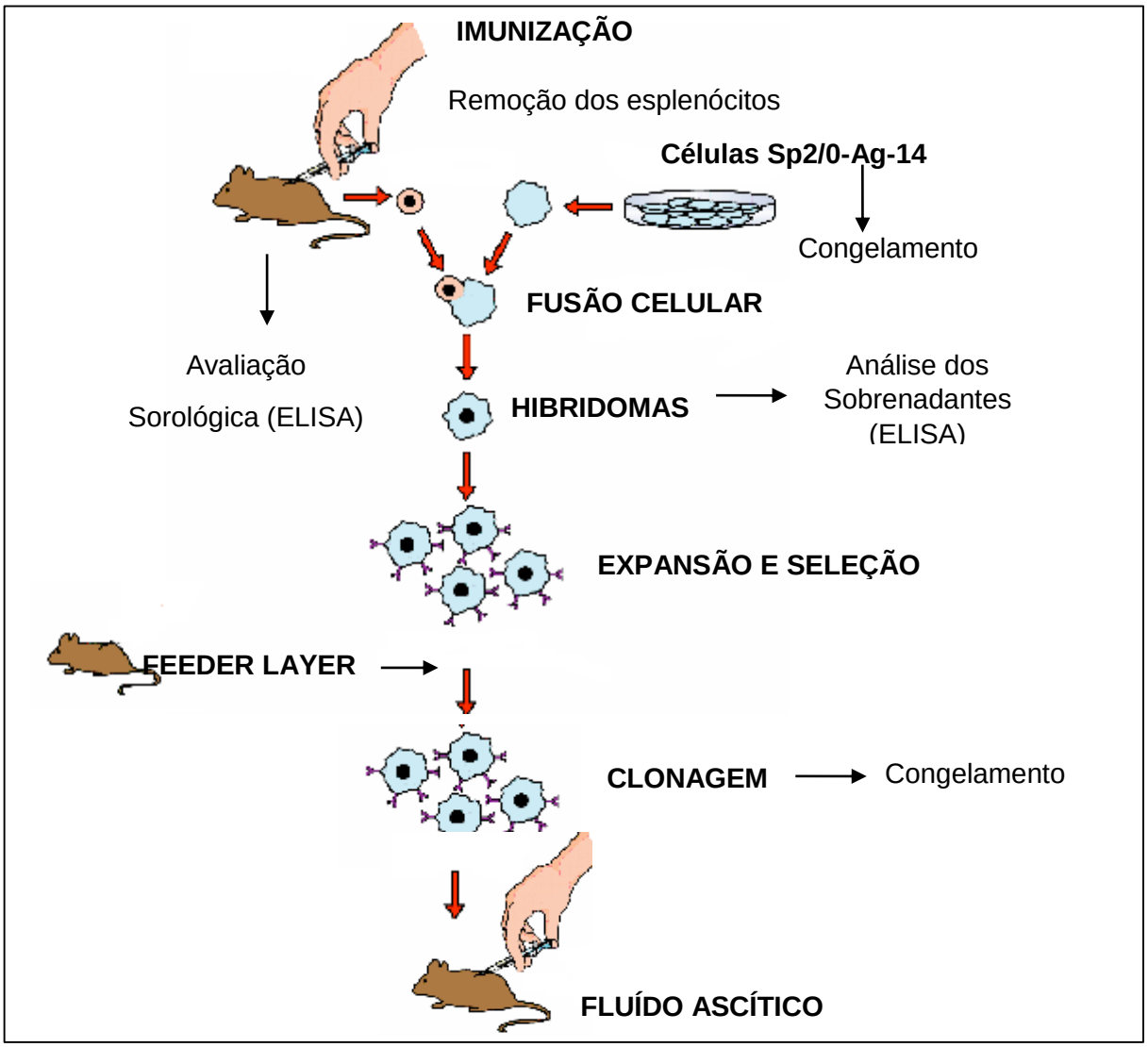



**FIGURA 12: Ilustração das etapas envolvidas na produção dos anticorpos monoclonais.**

### 3.4.1. Cultura celular da linhagem Sp2/0 Ag-14

As células de mieloma murino Sp2/0Ag-14 foram mantidas, em frascos para cultura celular de 75 $cm^3$, utilizando o meio RMPI-1640, suplementado com 10% (*v/v*) de soro fetal bovino, 25mg/L de gentamicina, 20 mM HEPES, 3,5 g/L glicose sob as condições de 37ºC, 5% $CO_2$. Para a manutenção das células Sp2/0Ag-14, o meio de cultura era trocado em intervalos de três dias. Inicialmente, a garrafa de cultura era inclinada, o meio antigo aspirado, utilizando uma pipeta estéril, evitando atingir as paredes do tubo. Em seguida, foram adicionados 15 mL do meio de cultura, previamente aquecido a 37ºC. Após atingirem a confluência de aproximadamente 80%, as células foram congeladas em criotubos e armazenadas em nitrogênio liquído. Para a criopreservação, as células foram desprendidas das paredes da garrafa de cultura, a suspensão retirada e colocada em um tubo de centrífuga de 50 mL. Uma alíquota foi retirada para contagem celular, através da câmara de Neubauer. A suspensão foi centrifugada (800 x g durante 4 minutos). O precipitado solubilizado com meio de cultura suplementado e adicionado lentamente 10% (v/v) de DMSO. Aproximadamente 1,5 mL foi adicionado em cada criotubo. Esses materiais foram colocados em ultra-freezer ( -80ºC) durante 24 h e em seguida, transferidos para o container de nitrogênio líquido (-196ºC). Para o descongelamento, o criotubo foi retirado do nitrogênio liquído e rapidamente descongelado, em banho maria, a 37ºC. 5 mL do meio de cultura suplementado foram adicionados e posteriormente, centrifugados a 800 x g durante 4 minutos. O precipitado foi solubilizado em 15 mL do meio de cultura suplementado e mantido a 37ºC, com 5% $CO_2$.

### 3.4.2. Imunização

Antes da imunização foram retiradas alíquotas de sangue, para obtenção do soro pré-imune, utilizado como controle negativo, nas avaliações sorológicas dos animais imunizados. Na etapa de imunização foram utilizados seis camundongos (entre 6-8 semanas de idade) para cada antígeno. Para obtenção dos anticorpos monoclonais anti-Cry1Ac e anti-$AFB_1$, 25 µg dos respectivos antígenos (1µg/µL) foram utilizados em cada dose por animal. Para a primeira dose, 25 µL de cada antígeno foi preparada em 25 µL do tampão PBS e com 50 µL do adjuvante completo de Freund's. Após emulsificação, 100 µL das soluções foram aplicadas, na cavidade peritoneal desses animais. Após duas semanas, foi aplicada uma segunda dose, preparada com adjuvante incompleto de Freund's. Decorridos sete dias, alíquotas de sangue foram coletados, da veia caudal desses animais para avaliação sorológica, realizada através de ensaios de ELISA indireto. Os animais com elevada titulação de anticorpos específicos receberam uma terceira dose (booster), preparada com o antígeno e PBS estéril, três dias antes da fusão.

### 3.4.3. Fusão celular e seleção dos hibridomas

Os procedimentos de fusão foram realizados pelo método descrito por Köhler, G e Milstein, C,1973, com modificações. Os animais selecionados foram submetidos à eutanásia por hipóxia, através do agente inalatório $CO_2$. O baço dos animais foi retirado, transferido para uma placa de petri, contendo meio de cultura (meio RMPI-1640, 25mg/L de gentamicina, 20 mM HEPES e 3,5 g/L glicose), e em seguida, levemente raspado, a fim de se obter os esplenócitos. Essas células foram coletadas, centrifugadas (800 x g durante 4 minutos) e o precipitado solubilizado com 15 mL do

meio de cultura, esse procedimento foi repetido três vezes. O precipitado, contendo os esplenócitos foi solubilizado em 5 mL do meio de cultura e fusionados com a linhagem de mieloma de camundongo, Sp2/0-Ag14 (1 x$10^7$ células/mL), após a adição de 1mL de PEG4000 (a cada ¾ gota, mistura lentamente as células). Em seguida, foi adicionado 6 mL do meio de cultura. Após 15 minutos, as células fusionadas foram centrifugadas e o precipitado solubilizado em, aproximadamente, 70 mL do meio de cultura (RMPI-1640, suplementado com 10% (*v/v*) de soro fetal bovino, 25mg/L de gentamicina, 20 mM HEPES, 3,5 g/L glicose e 10% (v/v) do agente de seleção, HAT). Em seguida, essa solução foi distribuída em seis placas de cultura de 96 poços (100µL/poço) e mantidas na incubadora de $CO_2$ a 37ºC. Após o aparecimento dos primeiros hibridomas (colônias crescidas) (entre 10-15 dias), os sobrenadantes das culturas foram avaliados por ELISA indireto. Os poços contendo hibridomas positivos foram transferidos para placas de cultura de 24, 12, 6 poços, frascos de cultura de 25 e 75 $cm^3$, respectivamente. Em cada transferência, os hibridomas positivos foram reavaliados através de ELISA indireto.

### 3.4.4. Preparação das placas Feeder Layer

Camundongos Balb/c (n-=2) foram submetidos à eutanásia por hipóxia, através do agente inalante, monóxido de carbono (CO). Em seguida, 10 mL do meio de cultura (RMPI-1640, suplementado com 10% (*v/v*) de soro fetal bovino, 25mg/L de gentamicina, 20 mM HEPES e 3,5 g/L glicose) foram injetados na cavidade peritoneal. Essa região foi massageada suavemente, todo o liquido recolhido e centrifugado (800 x g, durante 4 minutos). O precipitado foi solubilizado em 15 mL do meio (RMPI-1640, suplementado com 10% (*v/v*) de soro fetal bovino, 25mg/L de gentamicina, 20 mM HEPES, 3,5 g/L glicose RPMI e 10% (v/v) de *HT*. Essa solução foi dispensada em

placas de cultura de 96 poços (100 µL/poço) e mantidas na incubadora de $CO_2$ a 37ºC, durante 24 h antes da clonagem.

### 3.4.5. Clonagem dos Hibridomas

Após atingirem confluência de aproximadamente 80%, os hibridomas foram desprendidos das paredes dos frascos de cultura celular e posteriormente centrifugados, conforme descrito anteriormente. Os precipitados solubilizados em 5 mL do meio de cultura RMPI-1640, suplementado com 10% (*v/v*) de soro fetal bovino, 25mg/L de gentamicina, 20 mM HEPES, 3,5 g/L glicose RPMI e 10% de *HT* (v/v). Uma alíquota foi retirada para a quantificação, e aproximadamente 1,5 X $10^6$ células/mL foi utilizada para as etapas de diluição limitante. Inicialmente, 100 µL dessa suspensão celular foi adicionado 900 µL do meio de cultura (1,5 x $10^5$). Em seguida, 100 µL dessa diluição foi retirado e adicionado à 900 µL do meio de cultura. Esses procedimentos foram repetidos duas vezes, para se obter a concentração final de 1,5 x $10^2$ células/mL. A esse tubo foi adicionado 14 mL do meio de cultura. Essa suspensão foi dispensada, 100 µL/poço nas placas feeder layer, preparadas conforme descrito anteriormente, e mantidas na incubadora de $CO_2$ a 37ºC. Os sobrenadantes da cultura foram avaliados por ELISA indireto, expandidos para frascos de cultura de 75 $cm^3$. Alíquotas foram congeladas e posteriormente utilizadas para a produção de liquido ascítico.

Os hibridomas não utilizados para a clonagem foram adicionados aos frascos de cultura de 25 $cm^3$ e mantidos a 37ºC com 5% $CO_2$. Em seguida, expandidas para frascos de 75 $cm^3$ e posteriormente congelados conforme descrito em 3.4.1.

### 3.4.6. Produção *in vivo* e purificação dos anticorpos monoclonais

Uma semana antes da indução de ascite, cinco camundongos adultos (4-5 meses), da linhagem Balb/c, foram previamente tratados com 300µL da solução de pristane, por via intraperitoneal. Alíquotas dos clones obtidos foram descongelados, conforme descrito em 3.4.1, e mantidos, na incubadora de $CO_2$ a 37ºC, em meio RMPI-1640, suplementado com 10% (*v/v*) de soro fetal bovino, 25mg/L de gentamicina, 20 mM HEPES, 3,5 g/L glicose RPMI e 10% de *HT* (v/v) durante 48 h. Em seguida, essas células foram centrifugadas (800 x g durante 4 min), o precipitado solubilizado em 10 mL do meio de cultura e novamente centrifugado. O precipitado foi solubilizado em 6mL de meio de cultura e uma alíquota retirada para a quantificação. Aproximadamente, $1x10^6$ células/500 µL, para cada clone, foi aplicado na cavidade peritoneal dos animais. Após oito dias, esses animais foram submetidos à eutanásia, para a remoção do fluído ascítico. Esse material foi mantido temperatura de 37ºC, durante 1 hora e posteriormente, armazenado a 4ºC. Após 18 h, a solução foi centrifugada a 4.500 x g durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram submetidos à diálise contra o tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 8.0, utilizando membranas com poros de exclusão de 8-12kDa, durante 24 h a temperatura de 4ºC. Em seguida, esse material foi submetido à cromatografia de afinidade, utilizando a coluna comercial HiTrap™ proteína G. Os anticorpos monoclonais foram eluídos com tampão glicina-HCl 100 mM pH 2.7 e imediatamente neutralizados com uma solução de Tris 1 M pH 9.0. As frações contendo os anticorpos monoclonais foram reunidas e submetidas à dialise conforme descrito anteriormente. Em seguida, a concentração de IgG foi estimada utilizando o coeficiente de extinção: 1,36, de acordo com a fórmula:

$$\text{Concentração da amostra (mg/mL)} = \frac{Absorbância\ 280}{1{,}36}\ x\ \text{fator de diluição}$$

### 3.4.7. Caracterização dos anticorpos monoclonais

As subclasses IgG dos anticorpos monoclonais: anti-$AFB_1$ e anti-Cry1AC foram determinadas, utilizando o Kit comercial de ELISA ISO-2. Esse método determina a isotipagem dos anticorpos monoclonais produzidos em camundongos. Para esses ensaios, 100 μL dos sobrenadantes da cultura celular foram utilizados. Todos os demais procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

## 3.5. ENSAIOS DE ELISA

### 3.5.1. ELISA Indireto

As avaliações sorológicas dos animais imunizados, a seleção dos hibridomas positivos e a caracterização dos clones secretores de anticorpos monoclonais foram realizadas através de ELISA Indireto. Para esses ensaios, placas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas, separadamente, com 1μg dos antígenos: $AFB_1$–BSA, Cry8Ka5 e Cry1Ac, previamente preparados em solução de 50 mM Bicarbonato-Carbonato, pH 9.6 e mantido a 4ºC durante 18 h. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T (tampão PBS, contendo 0,05% Tween-20, pH 7,4). Em seguida 200 μL da solução de bloqueio (3% gelatina, preparada com PBS-T), foram adicionadas aos poços, mantidas por 45 minutos a 37ºC. Após os procedimentos de lavagem, 100 μL do soro dos animais imunizados, ou 100 μL dos sobrenadantes da cultura celular foi adicionado aos poços da placa e incubados por 1 hora a 37ºC. Após as etapas de lavagem, foram adicionados 100μL do anticorpo secundário (anti-mouse IgG-HRP) (1:5000), preparado com gelatina 1% em PBS-T. As microplacas foram mantidas durante 1 hora a 37ºC. Após os procedimentos de lavagem, 100μL da solução do

substrato TMB foi adicionado nos poços e mantidos por 10 minutos a temperatura ambiente. A reação foi finalizada após adição de 50 µL de 100 mM $H_2SO_4$. As leituras das absorbância foram obtidas utilizando o leitor Spectra Max M2 (Molecular Devices Corp; Sunnyvale, CA, USA), no λ=450 nm.

### 3.5.2 ELISA Competitivo

As avaliações da reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais anti-$AFLAB_1$ contra as aflatoxinas análogas: $AFB_2$, $AFG_1$, $AFG_2$ e $AFM_1$ foram determinadas através de ensaios de ELISA no formato competitivo. Inicialmente, as placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL dos anticorpos anti-$AFB_1$ (1:5000 ou 0,044 ng/mL), preparados em solução de 50mM Bicarbonato-Carbonato, pH 9.6 e mantidos à 4ºC durante 18 h. Após os procedimentos de lavagem, 50µL das soluções padrões das aflatoxinas: $AFB_1$, $AFB_2$, $AFG_1$, $AFG_2$ e $AFM_1$, preparadas em metanol-PBS, na proporção de 7:3, e 50 µL do conjugado $AFB_1$-HRP foram adicionados simultaneamente nos poços. Após 30 minutos de incubação a 37ºC, as placas foram lavadas e em seguida 100 µL do substrato TMB foi adicionado aos poços. Decorridos 10 minutos, a reação foi finalizada após adição de 50 µL de 100 mM $H_2SO_4$. A absorbância foi determinada a 450 nm. Os valores obtidos foram utilizados para determinar o $Ic_{50}$ das aflatoxinas. A reação cruzada (CR) foi determinada pela comparação do $IC_{50}$ das aflatoxinas análogas, utilizando a equação:

$$CR\ (\%) = \frac{IC\ 50\ AFB1}{IC\ 50\ Análogo} \times 100$$

### 3.5.3. ELISA de Captura

A seleção da dupla de anticorpos anti-Cry1Ac utilizada no desenvolvimento do respectivo teste de fluxo lateral foi determinada através de ensaios de ELISA de captura. Para isso, 100 μL dos anticorpos de captura, anti-Cry 1Ac (1:2000 ou 0,11ng/μL), previamente preparados em tampão bicarbonato-Carbonato 50mM, pH 9,6, foram sensibilizadas nas placas de ELISA e mantidas à 4ºC durante 18 h. Após os procedimentos de lavagem, 200 μL da solução de bloqueio foi adicionada as placas e mantidas a 37 ºC durante 1h. Após os procedimentos de lavagem, 1μg da proteína Cry1Ac foi adicionada aos poços e em seguida mantidas à 37 ºC durante 1h. Após procedimentos de lavagem, 100 μL do anticorpo anti-cry1Ac (1:2000 ou 0,11 ng/μL), proveniente de um clone diferente do primeiro anticorpo, foi adicionado aos poços e novamente mantidos à 37 ºC durante 1h. Após as etapas de lavagem, 100 μL do anticorpo de detecção, anti-mouse IgG-HRP ( 1:5000) foi então adicionado aos poços da placa e mantidos a 37 ºC durante 1 h. Para a revelação foi adicionado 100 μL da solução de TMB, mantidos a temperatura ambiente, durante aproximadamente 10 minutos. A reação foi finalizada após adição de 50 μL 100 mM $H_2SO_4$ e a absorbância determinada a 450 nm.

### 3.5.4. Determinação dos níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5 nos cultivares GM

Uma curva padrão foi estabelecida, através de ELISA de captura, utilizando as proteínas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5. Inicialmente, 11 ng do anticorpo monoclonal anti-Cry, foi imobilizado nos poços da placas de ELISA, durante 18 h a 4ºC. Após os procedimentos de lavagem, diferentes concentrações das proteínas

purificadas Cry1Ac e Cry8Ka5 (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 e 1 μg), foram adicionados nos poços e incubados durante 1 h a 37 ºC. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e posteriormente bloqueada a 37 ºC. Após 1 h as placas foram lavadas, para remoção da solução de bloqueio e em seguida, adicionado o segundo anticorpo monoclonal anti-Cry, na concentração de 11 ng/mL. A reação foi incubada a 37ºC durante 1 h. As placas foram novamente lavadas e o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com HRP (1:5000) foi adicionado aos poços e mantidos a 37ºC durante 1h. A revelação e análises de absorbância foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Os níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5 nos cultivares transgênicos foram obtidos através de ELISA de captura, utilizando os anticorpos monoclonais anti-cry e extratos de folhas dos algodoeiros: Bollgard I e EMBRAPA. Folhas do algodão não GM (Cultivar Cooker 312) foram utilizadas como controle negativo. Procedimentos similares para o ELISA de captura foram realizados conforme descrito anteriormente, exceto pela adição de 200 μL dos extratos foliares obtidos, ao invés da adição das proteínas Cry1Ac e Cry8ka5, como descrito anteriormente.

### 3.5.5. Avaliação da reatividade cruzada dos anticorpos α-Cry1Ac

Os anticorpos monoclonais purificados foram avaliados quanto à reatividade cruzada contra a proteína Cry8Ka5, através de ELISA indireto. Nesses ensaios, 1μg das proteínas recombinantes: Cry1Ac ou Cry8Ka5 foram sensibilizados nos poços das placas de ELISA, mantidos a 4ºC por 18h. Os procedimentos de lavagem e bloqueio foram realizados conforme descrito anteriormente. Nesses ensaios, 100 μL dos

diferentes anticorpos monoclonais α-Cry1Ac (1:200 ou 0,11 ng/mL) foram individualmente, adicionados aos poços das placas e mantidos a 37 ºC durante 1h. A ligação foi revelada conforme descrito em 3. 5.1.

### 3.5.6. Mapeamento dos epítopos da toxina Cry1ac reconhecido pelos anticorpos monoclonais

As sequencias peptídicas da toxina Cry1Ac: PT3b (PPRQGFSHRLSHV), PT4c (LGQGEYRTLSST), PT4d (IIRAPMFSWIHRSAE), PT5d (GTEFAYGTSPNL) e PT5e (FRRELTLTVLDI), foram sintetizadas e acoplados quimicamente com BSA pela empresa GensScript (USA), segundo o método descrito por Lateef et al., 2007. Esses peptídeos foram utilizados como antígenos e avaliados através de ELISA indireto. Para os ensaios de ELISA indireto, 1μg de cada peptídeo foi utilizado para sensibilizar as placas de ELISA. Após 18h a 4ºC, as placas foram lavadas e bloqueadas conforme descrito em 3.5.1. Em seguida, 100 μL dos anticorpos monoclonais anti-Cry1Ac (1:2000 ou 0,11 ng/μL) foram separadamente adicionados. Os mesmos procedimentos anteriormente descritos foram realizados.

## 3.6. DESENVOLVIMENTO DOS TESTES DE FLUXO LATERAL

### 3.6.1. Produção e Estabilização das partículas de ouro coloidal

As partículas de ouro coloidal (40 nm) foram obtidas a partir da redução do ácido cloroáurico trihidratado ($HAuCl_4 .3H_20$) com citrato de sódio 1% *(m/v)*, de acordo com o método descrito por Hayat, M.A, 1989. Inicialmente, 100 mL da solução $HAuCl_4$

.$3H_20$ *(m/v)* 0,2% foi aquecida a temperatura constante (100 ºC) e em seguida, adicionado 1,5 mL de citrato de sódio 1%. A solução foi mantida sob aquecimento e agitação constante. Após mudança na coloração da solução, partindo de amarelo claro até a cor vermelha com aspecto brilhante, a solução foi aquecida por mais 5 minutos, posteriormente coletada e armazenada a temperatura ambiente após adição de 0,05% de azida sódica ($NaN_3$). O tamanho predominante das partículas da solução coloidal foi determinada por espectroscopia de Uv-Vísivel, com pico máximo de absorbância a 650 nm.

Os anticorpos monoclonais, previamente selecionados para o desenvolvimento dos testes, foram submetidos a ensaios de otimização para determinar a concentração de anticorpos (µg/mL) necessário para a conjugação. Esses experimentos foram realizados de acordo com os métodos descritos por Horisberg,et al., 1975 e Geoghegan.W.D, 1988 com modificações. Inicialmente, diferentes concentrações dos anticorpos foram avaliadas, 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130 e 150 µg/mL. Em seguida 1 mL da solução de ouro coloidal (40nm) foi adicionado em cada microtubo e mantidos a temperatura ambiente. Após 1 minuto, uma solução de NaCl 10% (0,25 mL) foi adicionado à solução e a estabilização do conjugado monitorada visualmente.

### 3.6.2. Conjugação dos anticorpos monoclonais com nanopartículas de ouro coloidal

Os anticorpos monoclonais anti-$AFB_1$ e anti-Cry1Ac, previamente selecionados para o desenvolvimento dos testes, foram conjugados com as nanopartículas de ouro coloidal, de acordo com o método descrito por Biing-Hui, et al., 2013 com modificações. Inicialmente, 1 mL da solução dos anticorpo monoclonais, na

concentração determinada conforme descrito anteriormente, foi incubada com 10 mL da solução de ouro coloidal (pH 9,0) durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL da solução de BSA 10% (v/v), preparada em tampão borato de sódio 20 mM (pH 9.0), foi adicionada à solução, para impedir a agregação e bloquear sítios de ligação não específicos. Para remover o excesso de IgG a solução foi centrifugada (18.500 x g durante 30 min). O precipitado lavado com água deionizada e novamente centrifugado. O precipitado foi dissolvido em 2 mL de BSA 2% (pH 9.0) e armazenado a 4 ºC.

### 3.6.3. Preparação dos testes de fluxo lateral no formato *sandwich*

Esse formato foi utilizado para desenvolver os testes de fluxo lateral para a detecção das proteínas transgênicas: Cry1Ac e Cry8Ka5. Nesse sistema, o anticorpo monoclonal anti-cry1Ac e o anticorpo anti-mouse IgG foram adsorvidos na membrana de nitrocelulose, nas linhas teste e controle, respectivamente. Essas regiões foram separadas por uma distância de 5mm e as respectivas soluções dos anticorpos adicionadas à membrana, utilizando o equipamento BioDot XYZ3050, previamente calibrado na função *micro-brush* e com um volume de dispensação de 1μL /cm. O volume total dispensado na linha teste e controle foi de 0,5 μL da solução inicial. Após imobilização, a membrana foi mantida na estufa a temperatura de 37ºC durante 30 minutos. Após secagem, a membrana foi bloqueada com uma solução de BSA 2%, para prevenir adsorções não específicas e em seguida mantidas em um dessecador, com sílica, até a montagem das fitas.

Para a imobilização do anticorpo anti-cry1AC conjugado com as partículas de ouro coloidal na membrana de fibra de vidro (*conjugate pad),* o equipamento foi

calibrado para a função *air-brush*, com volume de dispensação de 10 μL/ cm. A concentração do anticorpo conjugado foi determinado conforme descrito em 3.7.1. Para cada fita teste, o volume total dispensado foi de 5μL. Após imobilização, o *conjugate pad* foi seco a 37ºC durante 30 minutos.

O *sample pad, absorbent pad* e *conjugate pad* foram previamente tratados com o tampão fosfato de sódio 20 mM, pH7,4, contendo 2% BSA *(m/v*), 2,5 % sacarose *(m/v),* 0,3% polivinilpirrolidona *(m/v),* (PVP) e 0,02% $NaN_3$, mantidos na estufa a 37ºC durante 18 h. Para a montagem das fitas teste, as membranas de nitrocelulose sensibilizadas com os respectivos anticorpos, o *conjugate pad* e o *absorbent pad* foram reunidos e em seguida cortados na espessura de 5mm x 70 mm, pelo equipamento CM 4000 Cutter da empresa Bio Dot (USA).

### 3.6.4. Preparação dos testes de fluxo lateral no formato competitivo

Esse formato foi utilizado para a produção das fitas-teste utilizados para a detecção de aflatoxinas. Nesse formato, soluções do antígeno $AFB_1$-BSA e do anticorpo anti-mouse IgG foram utilizadas para a adsorção na membrana de nitrocelulose, nas linhas teste e controle, respectivamente. Essas regiões foram separadas por uma distância de 5mm e as respectivas soluções adicionadas à membrana, utilizando o equipamento BioDot XYZ3050, previamente calibrado na função micro-brush, conforme descrito anteriormente. O volume total dispensado na linha teste e controle foi de 0,5 μL da solução inicial. As preparações das membranas de nitrocelulose, *conjugate pad, sample pad* e *absorbent pad* foram realizados conforme descrito anteriormente. A Figura 13, ilustra esquematicamente a produção dos testes de fluxo lateral.

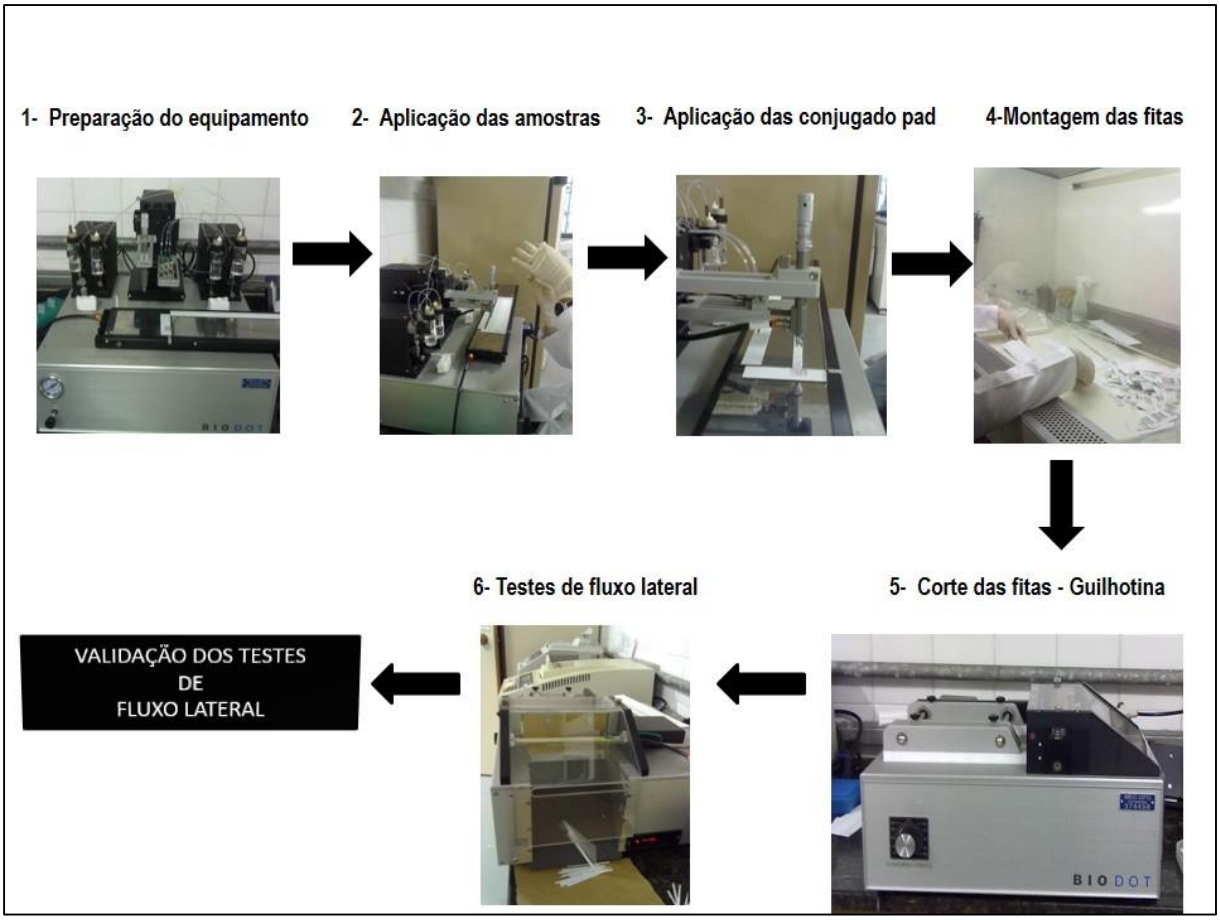



**FIGURA 13 : Etapas do fluxo de produção dos teste imunocromatográficos**

## 3.7. VALIDAÇÃO DOS TESTES DE FLUXO LATERAL (TFLs)

### 3.7.1. Validação *in vitro,* utilizando os testes de fluxo lateral, para a detecção da proteínas recombinantes: Cry1Ac e Cry8Ka5.

Soluções contendo as toxinas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5, foram utilizadas para validar os testes imunocromatográficos. As amostras na concentração inicial de 2,5 μg/μL foram preparadas em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6. Alíquotas de 200 μL, ou seja 0,5 μg, foram dispensadas em placas de 96 poços e

em seguida, as fitas testes foram introduzidas individualmente. As reações foram analisadas visualmente após 10 min.

### 3.7.2. Validação dos testes de fluxo lateral para a detecção das proteínas: Cry1Ac e Cry8Ka5 expressas em folhas de algodão transgênico.

Folhas provenientes das plantas de algodão GM: (Bollgard I ®) e EMBRAPA-planta 50, assim como, folhas do algodão não GM (Cocker 312) foram utilizadas para determinar a acurácia das fitas-teste desenvolvidas. Os procedimentos de extração foram realizados de acordo com o método descrito por Shan, et al., 2007. Folhas jovens (80 dias após germinação) foram coletadas, imediatamente congeladas, em nitrogênio líquido e trituradas para obtenção de uma farinha. Aproximadamente, 100 mg desse pó foi solubilizado em 1mL do tampão de extração (PBS, contendo 0,05% (v/v) Tween-20, 1% PVP-40 *(m/v)* e 0,032 mg/mL tripsina). A solução foi agitada durante 1h a temperatura de 37 ºC, em um shaker orbital. Em seguida, 22 μL de PMSF 10 mM foi adicionado à solução, para inibir a ação da tripsina. Posteriormente, esses extratos foram quantificados, para determinar os níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5, nos respectivos cultivares transgênicos, conforme descrito em 3.5.4. Para os ensaios de validação, 200 μL de cada extrato foram dispensados nas placas de 96 poços, em seguida introduzidas as fitas-teste. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e analisados após 10 minutos de reação.

### 3.7.3. Ensaios *in vitro* para determinar a sensibilidade do TFL para a detecção de $AFB_1$

Diferentes concentrações de $AFB_1$ (0,5; 0,25 μg e 0,125 μg/μL) foram adsorvidas na linha teste da membrana de nitrocelulose e avaliadas quanto a capacidade de produzir resultados positivos, quando testadas em amostras contendo 5 ng/mL de $AFB_1$ ou produzir resultados negativos, quando testadas contra amostras sem $AFB_1$.

### 3.7.4. Avaliação dos TFLs para a detecção de aflatoxinas em grãos de soja infestados com o fungo *Aspergillus flavus*

Estoques do fungo *A. flavus* foram mantidos em meio YES (yeast extract sucrose), como descrito por Davis et al., 1966. As cepas foram mantidas no escuro a temperatura de 25 ºC até a esporulação e estocada a 4ºC. Aproximadamente 100 g dos grãos de soja, provenientes do cultivar BR-16, foram autoclavados, em frascos de vidro e em seguida, adicionados 1mL da suspensão de esporos (2,32 x $10^7$conídios/mL). Os grãos inoculados foram mantidos no escuro, a 25ºC. Para o controle negativo foram utilizados grãos de soja, do mesmo cultivar e com a mesma massa, inoculados com 1mL de solução salina (PBS, pH 7,4), sob as mesmas condições. Após 14 dias, essas amostras foram, separadamente, trituradas e utilizadas para de extração de aflatoxinas. Inicialmente, 25 g da farinha de soja foram solubilizadas em tampão de extração (metanol/PBS, preparados na proporção de 7:3 *v/v*) e agitadas durante 10 minutos, a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado, alíquotas de 1mL foram retiradas e posteriormente diluídas com 4mL de PBS. Alíquotas de 200 μL foram dispensadas em microtubos, em seguida, as fitas testes

produzidas foram introduzidas. Os resultados foram avaliados visualmente após 10 minutos da reação.

Para determinar a sensibilidade dos testes, alíquotas dos extratos de soja infestados (50μL) foram quantificados e posteriormente diluídos a fim de se obter amostras nas concentrações de: 2,5 ng/mL, 0,5 ng/mL e 0,1 ng/mL. Em seguida, 200 μL de cada uma dessas soluções foram dispensadas em microtubos e as fitas testes produzidas adicionadas as amostras. Os resultados foram avaliados após 10 minutos da reação.

### 3.7.5. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos TFLs para a detecção de aflatoxinas em produtos alimentícios.

As avaliações da acurácia dos testes de fluxo lateral para a detecção de aflatoxinas foram realizadas utilizando as amostras alimentares: leite de soja e proteína de soja texturizada. A mesma marca dos respectivos produtos foi utilizada em todas as avaliações. Seis lotes foram coletados em diferentes supermercados da cidade de Brasília/DF, em 2014. Cada lote foi avaliado em triplicata, os resultados confirmados e quantificados, através do kit de ELISA comercial. Para avaliação do leite de soja, foi utilizado 200 μL (sem diluição) para cada fita teste. As amostras provenientes da proteína texturizada foram trituradas para obtenção de uma farinha. Vinte e cinco gramas (25 g) desse foi solubilizado no tampão de extração (metanol/PBS, preparado na proporção de 7:3 v/v e agitadas durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Alíquotas de 200 μL foram dispensadas em microtubos e introduzidos as fitas-teste. Os resultados foram avaliados visualmente após 10 minutos da reação.

## 3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad InStat ™ (GraphPad, V2.05). Os testes de ANOVA foram realizados utilizando os teste de comparação: Bonferroni e Tukey's com intervalos de confiança de 95%. Valores de $p<0,01$ e $p< 0,05$ foram considerados significativos.

# 4. RESULTADOS

## 4.1. PRODUTO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES: CRY1AC E CRY8KA5

O perfil eletroforético sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) dos produtos referentes a expressão e purificação das proteínas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5 está apresentado na Figura 14. As toxinas *Bt* recombinantes apresentaram massas moleculares em torno de 70 kDa. O percentual de pureza das proteínas recombinantes foi estimado em 95%, através do *software* Image Master 2D platinum (V.7.0, GE Healthcare).

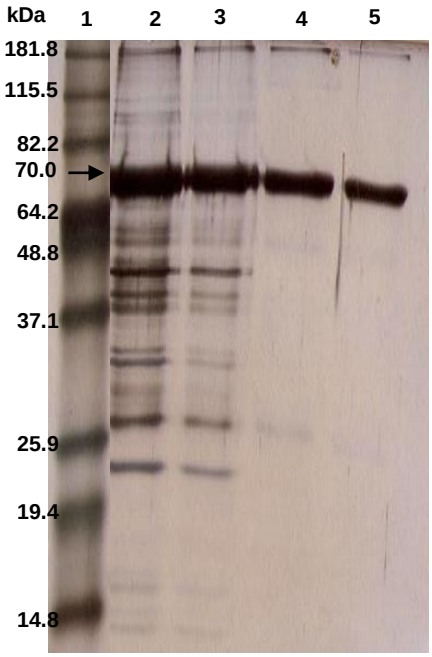



**FIGURA 14: Perfil eletroforético sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) da expressão e purificação das proteínas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5.** 1- Marcador de Massa Molecular (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen) 2- produtos da expressão heterológa da proteína Cry1Ac. 3-Produtos da expressão heteróloga da proteína Cry8Ka5. 4- Toxina Cry1Ac após digestão enzimática com tripsina e diálise. 5- Toxina Cry8Ka5 após eluição, com 200 mM de imidazol, da coluna de afinidade (HisTrap™).

## 4.2. ANÁLISE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS α-CRY1AC

Antes da imunização foram retiradas alíquotas de sangue dos camundongos, para obtenção do soro pré-imune, utilizado como controle negativo. Para verificar a resposta humoral dos animais imunizados, ensaios de imunoblot, do tipo dot-blot, foram realizados. Após análises, dois camundongos foram selecionados e avaliados sorologicamente, através de ELISA Indireto (Figura 15). Os soros dos animais imunizados apresentaram títulos elevados de anticorpos específicos, contra o antígeno Cry1Ac, quando comparados aos respectivos soros pré-imune.

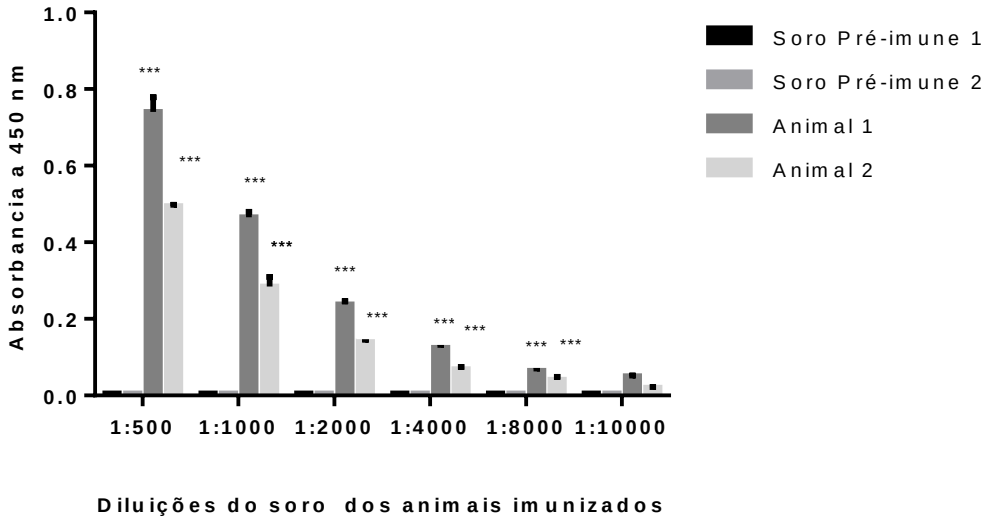



**FIGURA 15: Sorologia dos camundongos imunizados com a proteína Cry1Ac.** Micr**o**placas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com 1μg da proteína recombinante Cry1Ac e mantidas durante 18 h a 4ºC. As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em PBS-T. Uma alíquota de 100 μL das diluições do soro dos animais imunizados, após segunda dose, foi adicionado e mantidos durante 1 h a 37Cº. A ligação foi identificada através do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada utilizando 100 μL do substrato TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 μL de 100 mM $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm. As análises de variância foram realizadas utilizando o testes estatístico ANOVA. *** Significa $p< 0.05$

Diante disso, esses animais foram utilizados para obtenção dos hibridomas, através do procedimento de fusão celular. Os sobrenadantes das culturas foram analisados por ELISA Indireto. Inicialmente, trinta e sete hibridomas positivos foram identificados, como demonstrado na Figura 16.

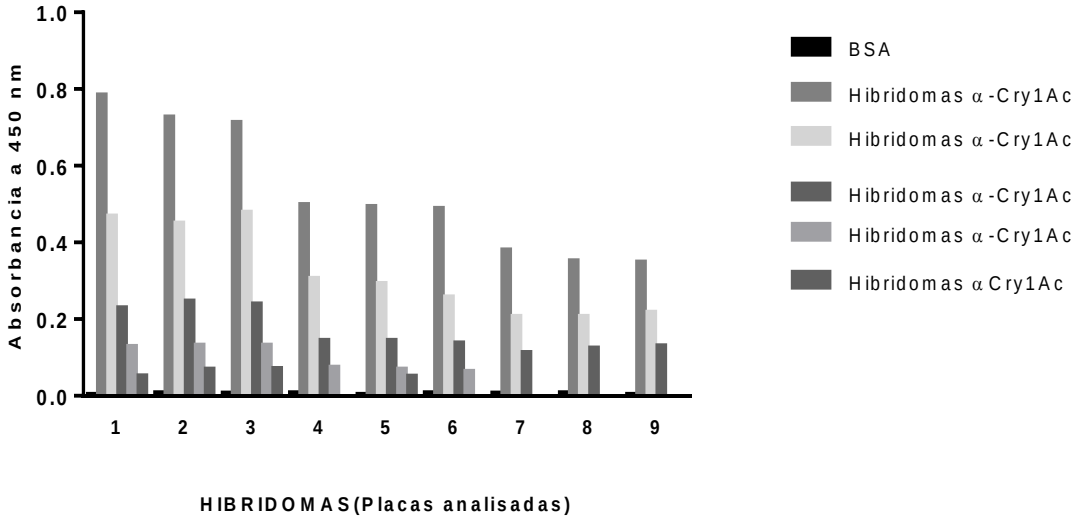



**FIGURA 16: ELISA indireto dos sobrenadantes da cultura celular dos hibridomas α-Cry 1Ac.** Microplacas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com 1μg da proteína recombinante Cry1Ac e mantidas durante 18 H a 4ºC. As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em PBS-T. Uma alíquota de 100 μL dos sobrenadantes das culturas foi adicionado e mantidos durante 1 h a 37 Cº. A ligação foi identificada através do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada utilizando 100 μL do substrato TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 μL de 100 mM $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm.

Esses hibridomas foram expandidos em cultura e analisados por ELISA durante todo o processo. Após os procedimentos de clonagem, foram obtidos cinco clones, identificados como: 1B1, 1B5, 5H4, 2E3 e 3C10. Os sobrenadantes da cultura foram analisados, através de ELISA Indireto, para determinar a especificidade dos anticorpos secretados. Como demonstrado na Figura 17, todos os anticorpos monoclonais foram específicos para a proteína Cry1Ac, quando comparado ao controle negativo, destacando-se o anticorpo 3C10, que nas mesmas concentrações apresentou maior reação.

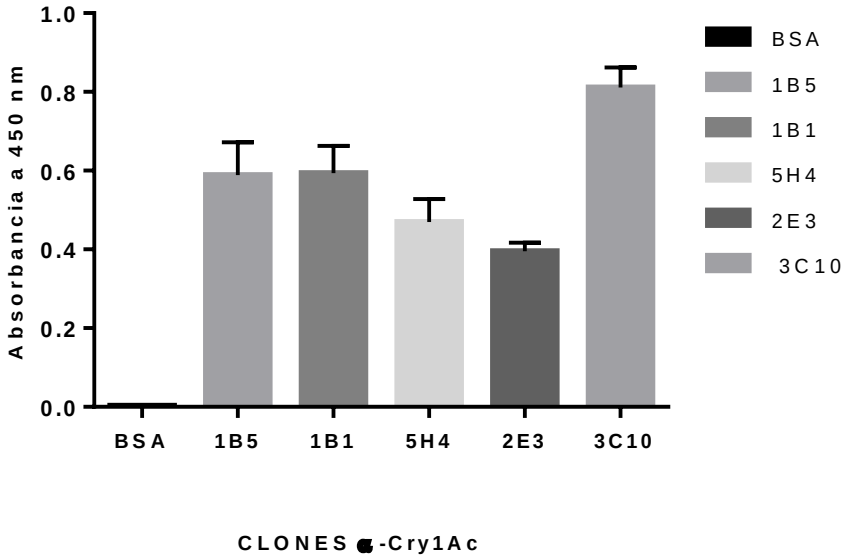



**FIGURA 17: ELISA Indireto dos sobrenadantes dos hibridomas α-Cry1Ac após clonagem.** Microplacas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com 1μg da proteína recombinante Cry1Ac e mantidas durante 18 h a 4ºC. As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em PBS-T. Uma alíquota de 100 μL dos sobrenadantes dos hibridomas após clonagem foi adicionado e mantidos durante 1 h a 37Cº. A ligação foi identificada através do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada utilizando 100 μL do substrato TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 μL de 100 mM $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm.

Os sobrenadantes da cultura foram caracterizados quanto a subclasse IgG, utilizando um kit comercial de ELISA (Tabela 1). Todos os clones foram classificados como IgG2b, exceto o clone 2E3 que foi identificado como IgG1.

**Tabela 1. Determinação da subclasse IgG dos anticorpos monoclonais α-Cry1Ac secretados pelos hibridomas após clonagem.**

| Clones α-Cry1Ac | Subclasse IgG |
|---|---|
| 1B1 | IgG2b |
| 1B5 | IgG2b |
| 5H4 | IgG2b |
| 2E3 | IgG1 |
| 3C10 | IgG2b |

Os clones foram expandidos em cultura e utilizados para obtenção dos fluidos ascíticos. Os respectivos anticorpos monoclonais foram purificados, através de cromatografia de afinidade, e analisados por eletroforese sob condições desnaturantes (Figura 18). A massa molecular de todos os anticorpos α-Cry1Ac purificados foi estimada em aproximadamente 150 kDa.

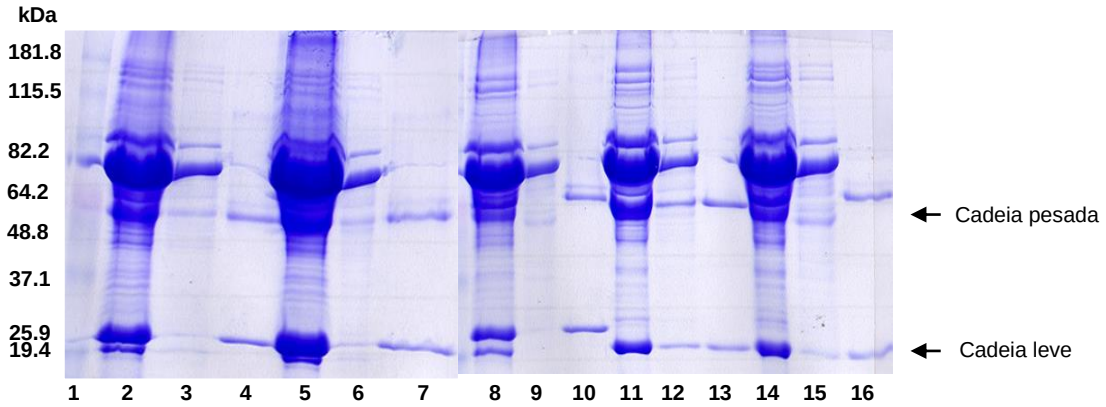



**FIGURA 18: SDS-PAGE dos anticorpos monoclonais (AcMos) α-Cry1Ac purificados através de cromatografia de afinidade.** 1- Marcador de massa **molecular** (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen) 2- Anticorpo 1B1 antes da purificação. 3- Fração não retida do anticorpo 1B1. 4- Anticorpo 1B1 purificado. 5- Anticorpo 1B5 antes da purificação. 6- Fração não retida do anticorpo 1B5. 7- Anticorpo 1B5 purificado. 8- Anticorpo 5H4 antes da purificação. 9- Fração não retida do anticorpo 5H4. 10- Anticorpo 5H4 purificado. 11- Anticorpo 2E3 antes da purificação. 12- Fração não retida do anticorpo 2E3. 13- Anticorpo 2E3 purificado. 14- Anticorpo 3C10 antes da purificação.15- Fração não retida do anticorpo 3C10. 16- Anticorpo 3C10 purificado. Foram aplicadas 5 µg de proteínas totais nos poços: 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 e 15. Foram aplicadas 1 µg dos anticorpos purificados nos poços: 3,7,10,14 e 16.

## 4.3. REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTICORPOS α- Cry1AC

Os diferentes anticorpos monoclonais α-Cry1Ac obtidos foram avaliados quanto à reatividade cruzada contra a proteína Cry8Ka5 (Figura 19). Os resultados demonstraram que todos os anticorpos monoclonais, com exceção do anticorpo proveniente do clone 2E3, foram capazes de reconhecer a toxina

Cry8Ka5. Por isso o anticorpo 2E3 não foi utilizado nas etapas de caracterização subsequentes.

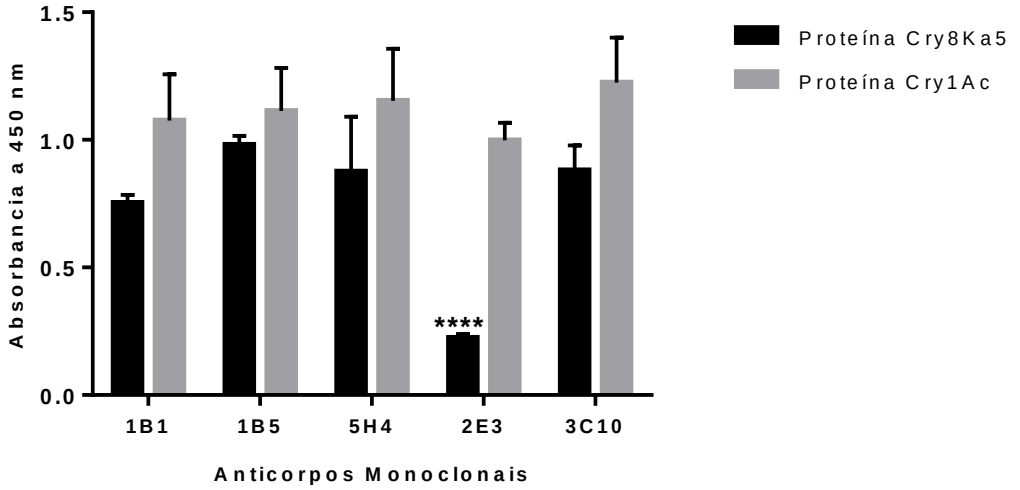



**FIGURA 19: ELISA Indireto da reação cruzada dos anticorpos α-Cry1Ac contra a proteína recombinante Cry8Ka5.** Microplacas de ELISA foram sensibilizadas com 1μg das proteínas recombinantes Cry1Ac ou Cry8Ka5, mantidas durante 18 h a 4ºC. As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em PBS-T. Uma alíquota de 100 μL de cada anticorpo monoclonal purificado (1:2000) foi adicionado e mantidos durante 1h a 37Cº. A ligação foi identificada através do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada utilizando 100 μL do substrato TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 μL de 100 mM $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm. As análises de variância foram realizadas utilizando o testes estatístico ANOVA. ** Significa p< 0.05

## 4.4. ANÁLISE DOS EPÍTOPOS DA TOXINA Cry1AC RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

Sequencias peptídicas da proteína Cry1Ac, essenciais para a interação com os receptores específicos de *Helicoverpa armigera* (HadCad), foram sintetizadas quimicamente e utilizados para o mapeamento dos epítopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais produzidos. A Figura 20 apresenta os resultados da interação dos monoclonais contra esses peptídeos. Todos os anticorpos monoclonais reconheceram as sequencias peptídica testadas, no entanto, os anticorpos 1B1 e 5H4 apresentaram maior afinidade pelas sequencias: PT4d (IIRAPMFSWIHRSAE) e PT5d (GTEFAYGTSPNL),

respectivamente (P< 0.05), sugerindo que esses anticorpos monoclonais reconhecem regiões peptídicas diferentes da proteína Cry1Ac.

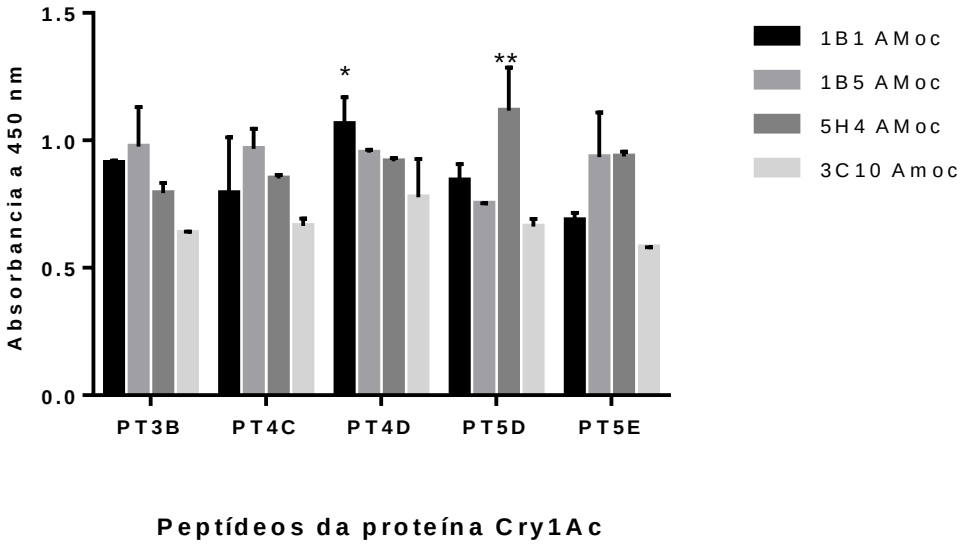



**FIGURA 20: ELISA Indireto, dos epítopos da proteína Cry1Ac reconhecidos pelos anticorpos monoclonais.** Os peptídeos foram conjugados com BSA e sensibilizados em microplacas de ELISA (1μg) durante 18 h a 4ºC**.** As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em PBS-T. Uma alíquota de 100 μL de cada anticorpo monoclonal purificado (1:2000) foi adicionado e mantidos durante 1h a 37 Cº. A ligação foi identificada através do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada utilizando 100 μL do substrato TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 μL de 100mM $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm. As análises de variância foram realizadas utilizando o testes estatístico ANOVA. ** Significa p< 0.05.

Para confirmar esses resultados, foi realizado um ELISA de captura. Os resultados da combinação dos pares dos anticorpos α-Cry1Ac estão demonstrados na Figura 21. A combinação 5H4 e 1B1 apresentou uma elevação significativa na intensidade da absorbância (p<0.01) quando comparado aos demais pares, evidenciando que esses anticorpos reconhecem regiões distintas da proteína Cry1Ac. Por isso foram selecionados para a produção das fitas teste.

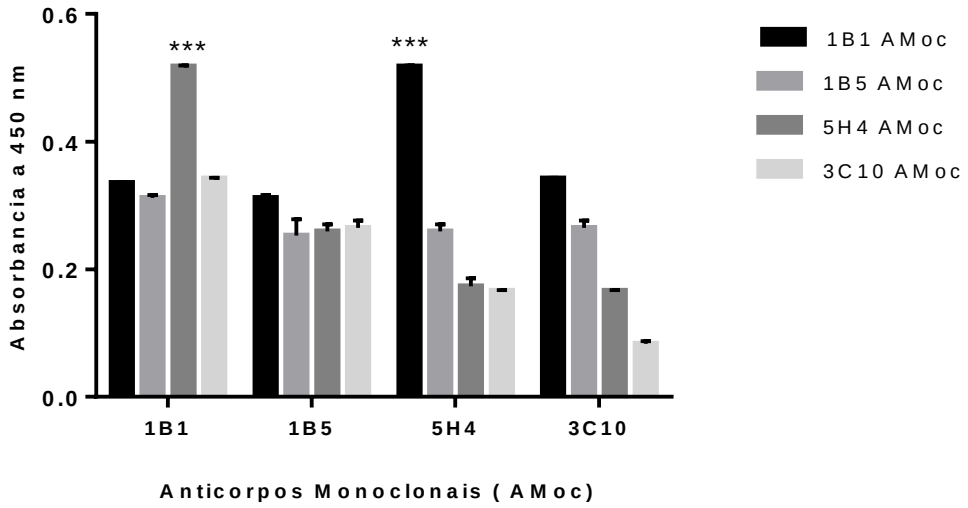



**FIGURA 21: Interação dos anticorpos monoclonais α-Cry1Ac através de ELISA de captura.** Microplacas de ELISA foram sensibilizados com 100 μL do anticorpo monoclonal na concentração de 1:2000 preparada em tampão 50 mM carbonato-bicarbonato pH 9,6 e mantidos durante 18 h a 4ºC. As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em tampão PBS-T. Em seguida, 1μg da proteína Cry1Ac foi adicionada e mantida a 37 ºC durante 1h. Uma alíquota de 100 μL do segundo anticorpo monoclonal (1:2000) foi adicionada e incubada durante 1h a 37ºC. A ligação foi identificada através do anticorpo de detecção, anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada através do substrato específico TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 μL de 100 mM $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm. As análises de variância foram realizadas utilizando o testes estatístico ANOVA. *** Significa p< 0.05.

## 4.5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS TFLs PARA A DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry1Ac e Cry8Ka5.

As fitas teste foram desenvolvidas no formato direto ou “sandwhich”, como ilustrado na Figura 22. O anticorpo monoclonal 1B1 foi conjugado com nanopartículas de ouro coloidal e em seguida, adsorvidos no conjugate pad.

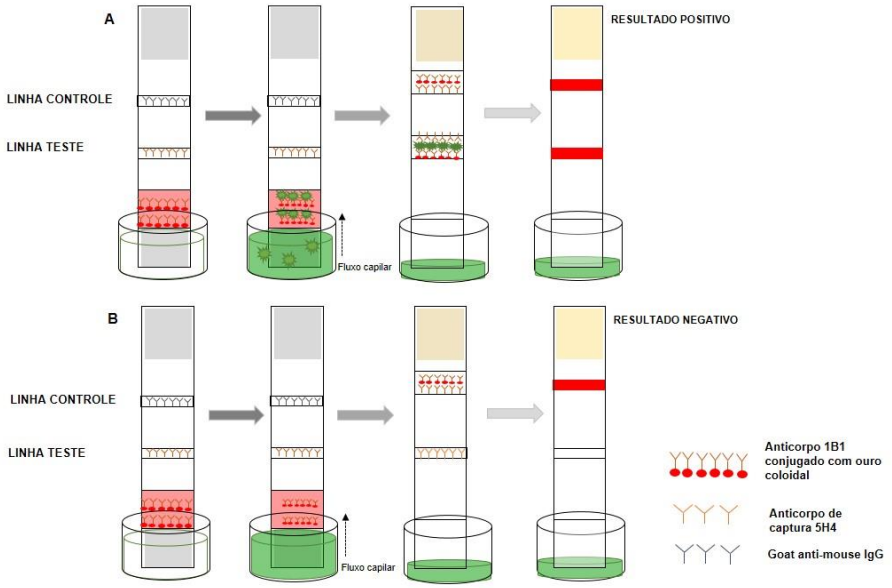



**FIGURA 22: Formato e princípio do teste desenvolvido para a detecção das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5 expressas em cultivares GM** A- amostras contendo as proteínas transgênicas Cry1Ac ou Cry8Ka5. B- Amostras sem a presença das proteínas transgênicas Cry1Ac e Cry8Ka5. Fonte Santos et al., 2015**.**

A concentração do anticorpo α-Cry1Ac 1B1 necessária para a conjugação foi determinada pelo método descrito por Horrisberg et al., 1975. A Figura 23 apresenta os resultados obtidos para essa padronização. Concentrações abaixo de 70 μg/mL não permitem a estabilização do anticorpo com as nanopartículas de ouro coloidal, após adição de solução salina, essa alteração é observada com a mudança de coloração de vermelho para azul. Concentrações no intervalo entre 100-200 μg/mL favorecem a formação de conjugados estáveis. Diante disso, a concentração de 150 μg/mL foi padronizada para os procedimentos de conjugação. Concentrações superiores, também não afetam a estabilidade, no entanto, indicam um excesso de anticorpo.

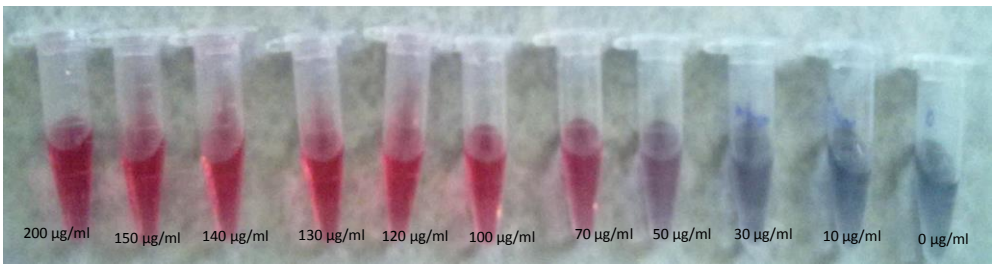



**FIGURA 23: Determinação da concentração do anticorpo α-Cry1Ac 1B1 utilizada nos procedimentos de conjugação com nanopartículas de ouro coloida (40 nm).** Com exceção do tubo 0 (sem anticorpo), todos os microtubos contém 25 µL da solução do anticorpo α-Cry1Ac 1B1 em diferentes concentrações. Foi adicionado 0.5 mL da solução de ouro coloidal produzida (40 nm) e posteriormente adicionada 25 µL da solução de NaCl 10%

As fitas teste foram produzidas utilizando 0,5 µg do anticorpo anti-mouse IgG, adsorvido na membrana de nitrocelulose, na região da linha controle. Para determinar a concentração do anticorpo de captura 5H4, na linha teste, foram adsorvidos na membrana de nitrocelulose, diferentes massas do anticorpo: 1µg; 0,5 µg e 0,125 µg. Em seguida, esses protótipos foram avaliados através de ensaios diretos de detecção, utilizando a proteína recombinante Cry1Ac, na concentração de 0,5 µg. Como demonstrado na Figura 24, não houve diferença entre os resultados positivos, quando foram adsorvidos 1µg e 0,5 µg. No entanto, houve um sinal fraco na linha teste quando foi utilizado o valor de 0,125 µg. Portanto, o valor de 0,5 µg do anticorpo 5H4 foi estabelecido para a produção das fitas teste.

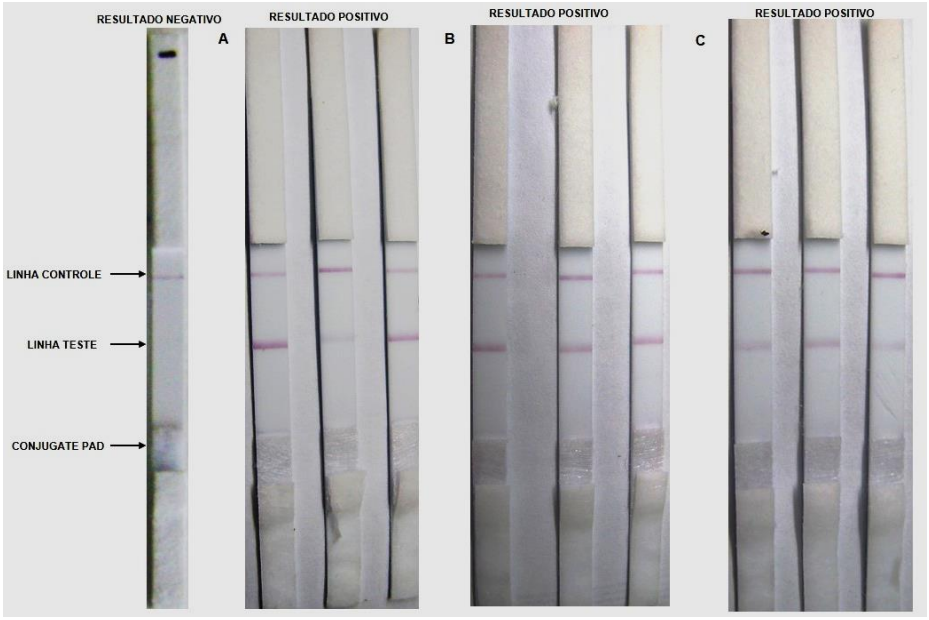



**FIGURA 24: Padronização da concentração do anticorpo α-Cry1Ac 5H4 na linha teste.** Foram utilizados para a produção do teste: 0,5 μg do anticorpo anti-mouse IgG na linha controle e 0,38 μg do anticorpo 1B1- conjugado com nanopartículas de ouro coloidal no conjugate pad. A- Adsorvido 1 μg do anticorpo 5H4 na linha teste. B- Adsorvido 0,5 μg do anticorpo 5H4 na linha teste. C- Adsorvido 0,125 μg do anticorpo 5H4 na linha teste.

As fitas teste desenvolvidas foram validadas, através de ensaios *in vitro,* utilizando as proteínas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5. Como demonstrado na Figura 25, os testes apresentaram reação-cruzada para a proteína Cry8Ka5. As fitas testadas com amostras contendo essas proteínas apresentaram resultados positivos, caracterizados pela presença de duas linhas vermelhas, uma na região teste e a outra na linha controle. No entanto, quando avaliadas contra amostras sem as proteínas *Bt* (controle negativo), as fitas apresentaram apenas uma linha vermelha na região controle, caracterizando um resultado negativo. Além disso, os resultados demonstraram que os testes desenvolvidos

apresentaram elevada sensibilidade, visto que foram capazes de detectar essas proteínas em baixas concentrações (0,5 μg).

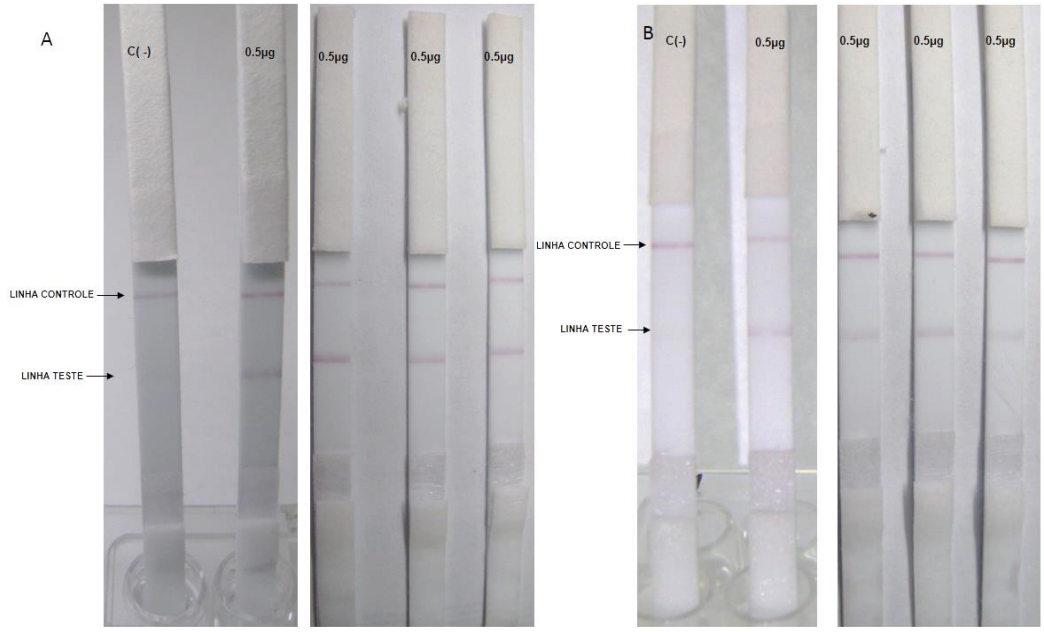


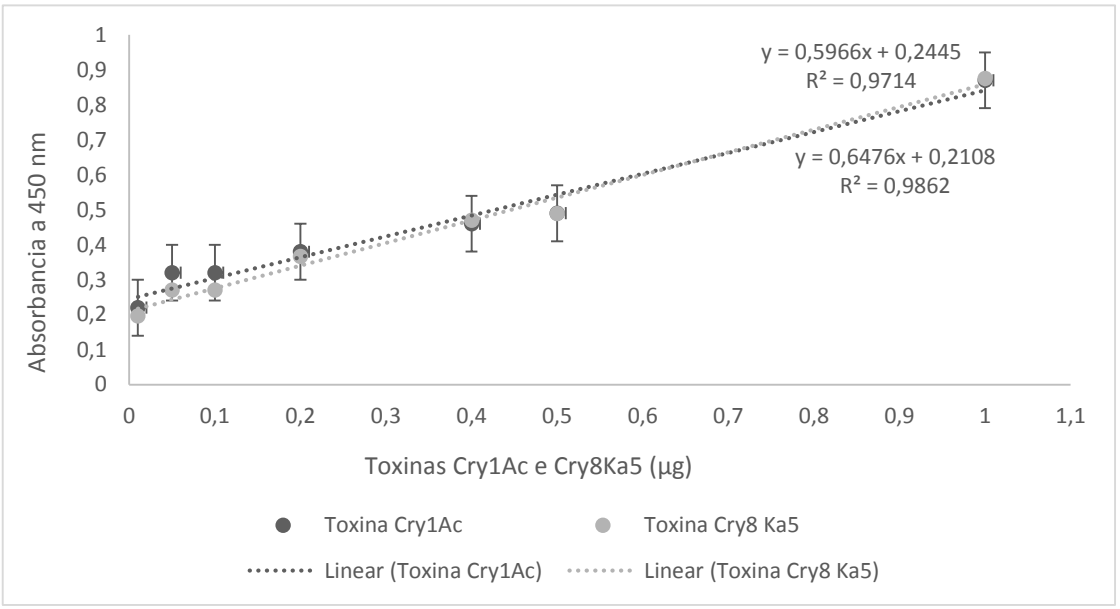

**FIGURA 25: Avaliação das fitas imunocromatográficas para a detecção das proteínas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5. A**- Os testes foram avaliados utilizando 0,5 μg da toxina recombinante Cry1Ac. **B-** Os testes foram avaliados utilizando 0,5 μg da toxina recombinante Cry8Ka5. **C(-)** Controle negativo sem as proteínas Bt (200μL do Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,05 M, pH 9,6).

Os ensaios de validação também foram realizados utilizando folhas do algodoeiro GM: Bollgard® e EMBRAPA (plantas desenvolvidas no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga). Como controle negativo, foi utilizado folhas provenientes do algodoeiro não transgênico Cooker 312. Os níveis de expressão das proteínas expressas nos cultivares transgênicos Cry1Ac (Bollgard®) e Cry8ka5 (EMBRAPA) foram estimadas através de ELISA indireto, utilizando as proteínas recombinantes Cry1Ac e Cry8Ka5 (0 a 1 μg). A quantificação resultou em curva padrão com linearidade de $R^2$= 0.9714, para a proteína Cry1Ac e $R^2$=0.9862, para a proteína Cry8Ka5 (Figura 26A). Plantas de algodão GM, desenvolvidas em no nosso laboratório, foram analisadas, através de PCR e

resultaram em duas plantas positivas, identificadas como planta 50 e planta 217. Essas plantas foram posteriormente caracterizadas, através de ELISA *de* Captura*,* utilizando os anticorpos monoclonais α-Cry 1B1 e 5H4. Como demonstrado na Figura 26 B, apenas a planta 50 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$), quando comparada ao controle negativo, por isso, foi utilizada nas avaliações posteriores.

Folhas provenientes do algodão GM: Bollgard® e EMBRAPA (Planta 50), e do algodoeiro não transgênico Cooker 312 (controle negativo) foram utilizados nos ensaios de acuracidade das fitas teste desenvolvidas. Como demonstrado na Figura 27, as fitas teste foram capazes de distinguir entre amostras GM e não GM. Duas linhas vermelhas foram claramente visualizadas quando amostras GM, contendo as proteínas Cry 8Ka5 e Cry1Ac foram analisadas (Figura 27 A e B, respectivamente). Contrariamente, quando amostras não GM foram analisadas apenas uma linha vermelha, na região controle foi visualizada.

**A**




**B**

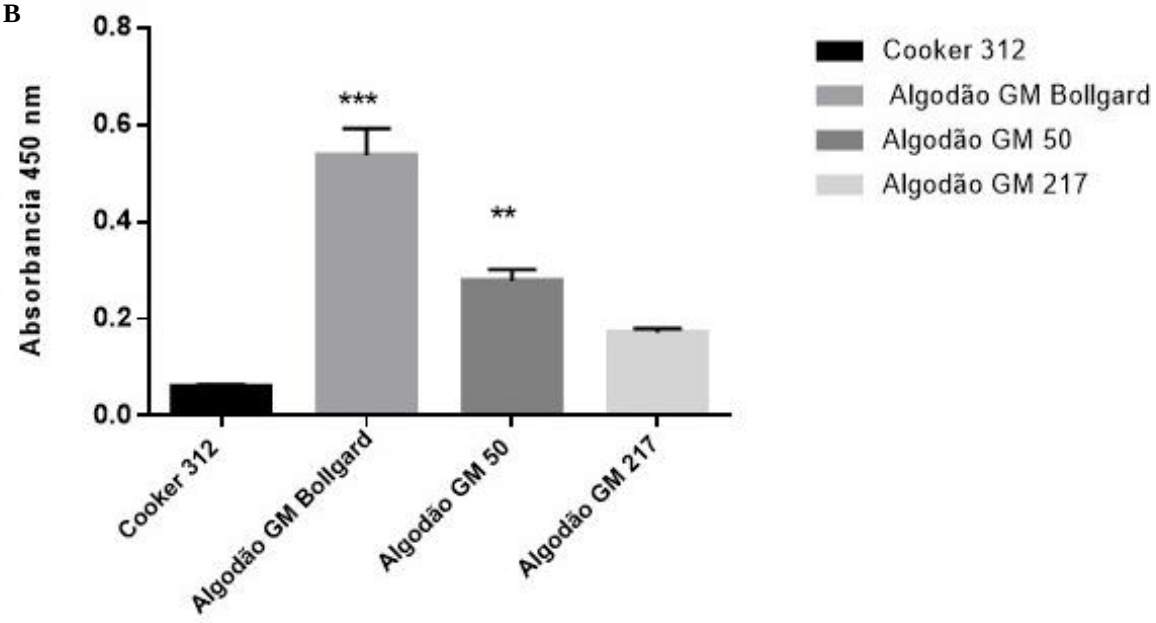



**FIGURA 26: Sensibilidade e acurácia dos anticorpos monoclonais α-Cry na detecção de cultivares GM**. **A-** Curva padrão para a quantificação das toxinas Cry1Ac e Cry8Ka5 (0-1µg) através de ELISA de captura, utilizando o anticorpo 1B1. **B-** Detecção das proteínas transgênicas Cry1Ac (Algodão Bollgard ®) utilizado como controle positivo) e da proteína Cry8Ka5 (Algodão GM EMBRAPA planta 50 e 217) através de ELISA *Sandwhich*, utilizando os anticorpos 1B1 e 5H4. ** As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA e p< 0.05 significa estatisticamente significativo.

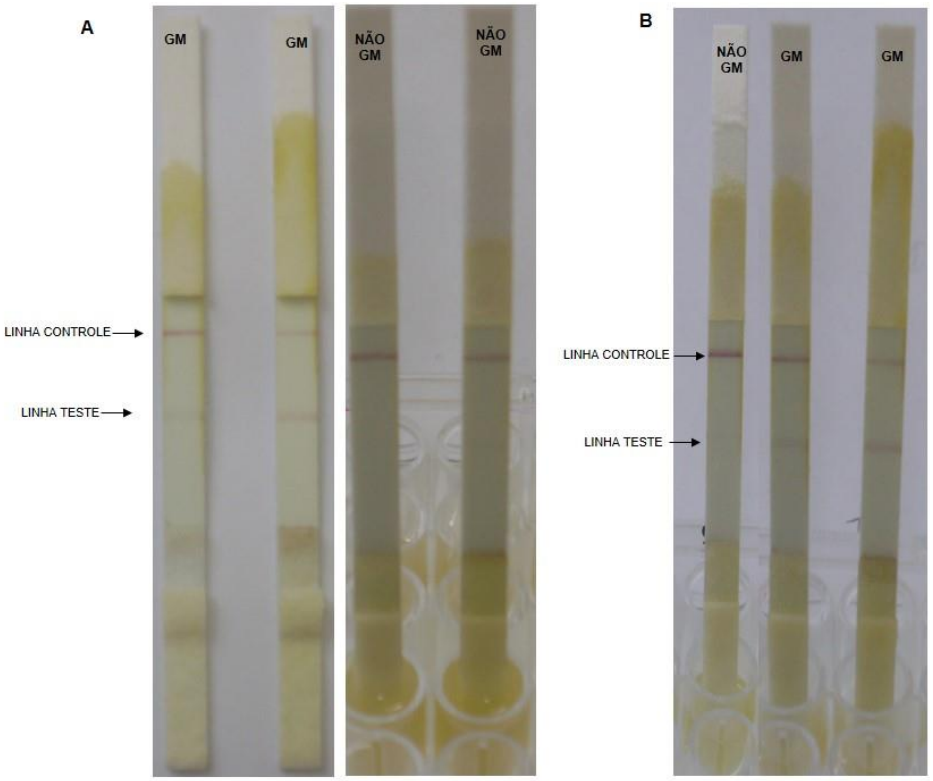



**FIGURA 27: Validação das fitas teste para a detecção das proteínas transgênicas Cry1Ac e Cry8Ka5 em extratos proteicos de folhas de plantas de algodão GM.** A. Extratos proteícos de folhas provenientes do algodão EMBRAPA (planta 50) contendo a toxina Cry8Ka5. B- Amostras de folhas provenientes do algodão Bollgard ®, contendo a toxina Cry1Ac. Não GM (controle negativo) - Amostras de folhas provenientes do algodão Cooker 312.

## 4.6. ANÁLISE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS α-AFLAB$_1$

Após as etapas de imunização, os animais foram previamente avaliados por imunoblot, utilizando a técnica de dot-blot. Em seguida, a sorologia desses animais foi determinada, através de ELISA indireto (Figura 28).

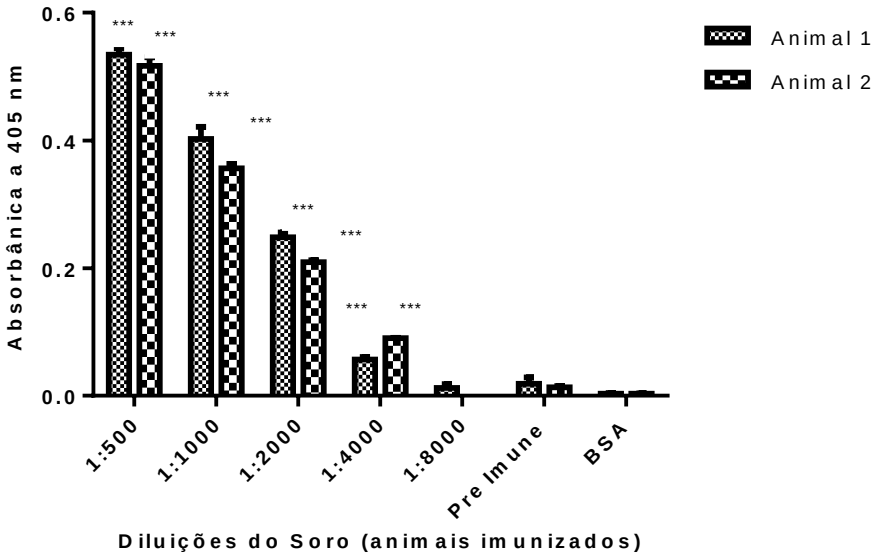



**FIGURA 28: Sorologia dos camundongos imunizados com a toxina $AFB_1$.** Micr**o**placas de ELISA foram sensibilizadas com 1µg de $AFB_1$-BSA e mantidas durante 18 h a 4ºC. As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em PBS-T. Uma alíquota de 100 µL das diluições do soro dos animais imunizados, após segunda dose, foi adicionado. Em seguida, mantidos durante 1 h a 37Cº. A ligação foi identificada através do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada utilizando 100 µL do substrato TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 µL de 100 mM $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm. As análises de variância foram realizadas utilizando o testes estatístico ANOVA. ** Significa p< 0.05

Os animais apresentaram títulos satisfatórios de anticorpos específicos, quando comparado ao soro pré-imune e por isso, foram utilizados nos procedimentos para obtenção dos hibridomas. Após essa etapa, os sobrenadantes das culturas foram avaliados, através de ELISA indireto. Como demonstrado na Figura 29, dezenove hibridomas positivos, secretaram anticorpos contra o antígeno $AFB_1$-BSA.

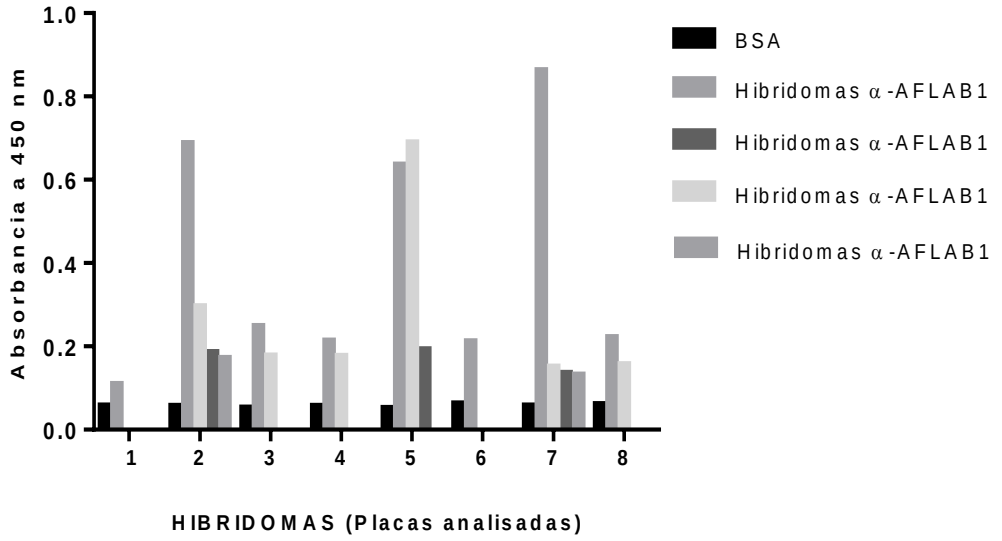



**FIGURA 29: ELISA indireto dos sobrenadantes da cultura celular dos hibridomas α-AFLAB$_1$.** Microplacas de ELISA foram sensibilizadas com 1μg da solução padrão de AFB1-BSA e mantidas durante 18h a 4ºC. As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em PBS-T. Uma alíquota de 100 μL dos sobrenadantes das culturas foi adicionado e mantidos durante 1 H a 37ºC. A ligação foi identificada através do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada utilizando 100 μL do substrato TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 μL de 2M $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm.

Os hibridomas foram expandidos em cultura e posteriormente, submetidos aos procedimentos de clonagem. Os sobrenadantes da cultura foram analisados através ELISA Indireto e os resultados apresentados na Figura 30. Seis clones secretores de anticorpos monoclonais contra $AFB_1$ foram identificados: 1A5,1F2,3A5, 3B6, 2E5 e 2A11.Todos os anticorpos foram específicos para a $AFB_1$, quando comparado ao controle negativo (BSA), no entanto, os monoclonais 3A5 e 3B6 apresentaram maior sensibilidade ($p<0.001$) quando comparados aos demais grupos. Por isso esses anticorpos foram selecionados para as caracterizações posteriores.

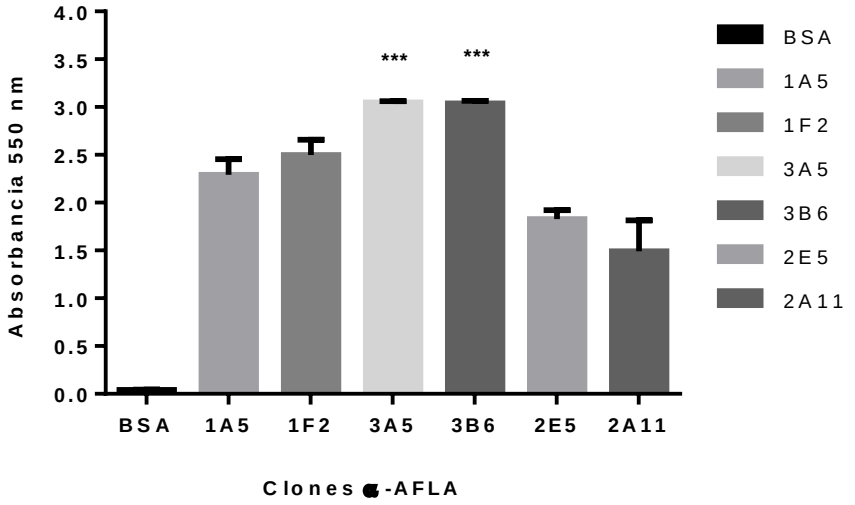



**FIGURA 30: ELISA Indireto dos sobrenadantes da cultura celular dos hibridomas α-AFLAB$_1$ após clonagem.** Microplacas de ELISA foram sensibilizadas com 1μg da solução padrão de AFB1-BSA e mantidas durante 18 h a 4ºC. As placas foram bloqueadas com gelatina 3% preparada em PBS-T. Uma alíquota de 100 μL dos sobrenadantes das culturas foi adicionado e mantidos durante 1h a 37ºC. A ligação foi identificada através do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (1:5000) e revelada utilizando 100 μL do substrato TMB. A reação foi finalizada após adição de 50 μL de 2M $H_2SO_4$. A absorbância foi quantificada a 450 nm.

A caracterização dos anticorpos monoclonais, secretados por esses clones, foram avaliados por um kit comercial de ELISA e os resultados apresentados na tabela 2. Os anticorpos foram predominantemente classificados como IgG1, exceto os anticorpos 3A5 e 3B6, que foram identificados como membros da subclasse IgG3.

**Tabela 2**. **Determinação da subclasse IgG dos anticorpos monoclonais α-AFB$_1$ obtidos a partir dos clones secretores.**

| Clones α-AFB$_1$ | Subclasse IgG |
|---|---|
| 1A5 | IgG1 |
| 1F2 | IgG1 |
| 3A5 | IgG3 |
| 3B6 | IgG3 |
| 2E5 | IgG1 |
| 2A11 | IgG1 |

Os clones 3A5 e 3B6 foram inoculados na cavidade peritoneal dos camundongos para obtenção dos fluidos ascíticos. Os respectivos anticorpos foram purificados e analisados por eletroforese sob condições desnaturantes (Figura 31). A massa molecular dos anticorpos α-$AFLAB_1$ foi estimada em aproximadamente 160 kDa.

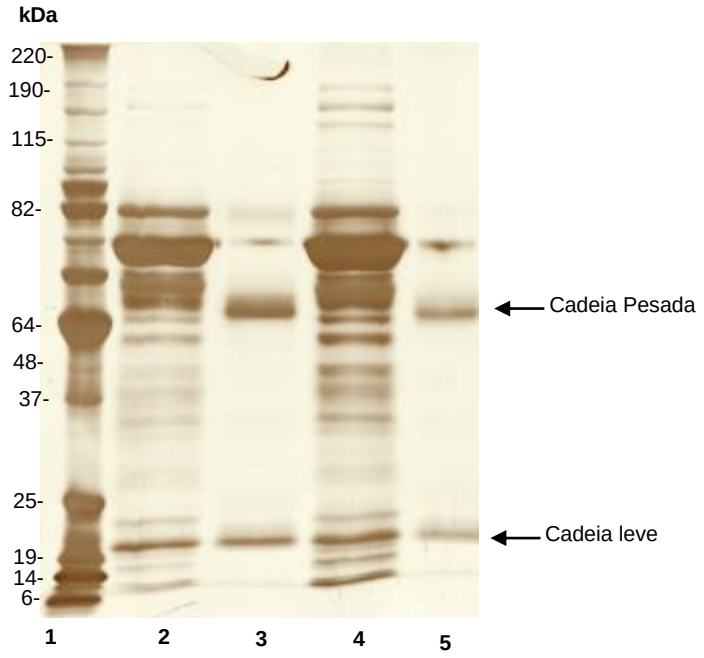



**FIGURA 31: SDS-PAGE dos anticorpos monoclonais (AcMos) α-AFLAB1 purificados através de cromatografia de afinidade.** 1- Marcador de massa **molecular** (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen) 2- Anticorpo 3A5 Antes da purificação. 3- Anticorpo 3A5 purificado. 4- Anticorpo 3B6 antes da purificação. 5- Anticorpo 3B6 purificado. Foram aplicadas 5 μg de proteínas totais nos poços: 2 e 4. Foram aplicadas 1 μg dos anticorpos purificados nos poços: 3 e 4.

As reatividades cruzadas dos anticorpos purificados: 3A5 e 3B6 contra aflatoxinas análogas estão apresentados na tabela 3. O anticorpo 3B6 é quatro vezes (4 x) mais sensível para a detecção do antígeno AFB1, (Ic 50 = 0,97) que o anticorpo 3A5 (Ic 50 = 3,9). Além disso, também apresentou maior reatividade cruzada contra as toxinas análogas: AFM1 (100%) e AFG1 (98,9%). Diante

disso o anticorpo 3B6 foi selecionado para o desenvolvimento das fitas teste para a detecção de aflatoxinas.

**Tabela 3 – Percentual da reatividade cruzada dos anticorpos α-AFLAB$_1$ contra aflatoxinas análogas.**

| | AMoc 3A5 | | AMoc 3B6 | |
|---|---|---|---|---|
| **Aflatoxinas** | Ic $_{50}$ (ng/mL) [a] | Reação Cruzada (%) [b] | Ic $_{50}$ ( ng/mL) [a] | Reação Cruzada (%) [b] |
| $AFB_1$ | 3,9 | 100 | 0,97 | 100 |
| $AFB_2$ | 7,38 | 52,8 | 1,4 | 69,3 |
| $AFG_1$ | 3,96 | 98,5 | 0,98 | 98,9 |
| $AFG_2$ | 6,63 | 58,8 | 1,21 | 80,4 |
| $AFM_1$ | 4,63 | 84,2 | 0,97 | 100 |

[a] Ic $_{50}$ corresponde a concentração (ng/mL) de aflatoxina capaz de inibir em 50% a reação colorimétrica

[b] A reação- cruzada (%) foi determinada pela equação $Ic_{50\ AFB1}$/ $Ic_{50}$ (aflatoxinas análogas) x 100

## 4.7. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS TESTES DE FLUXO LATERAL PARA A DETECÇÃO DE AFLATOXINAS EM PRODUTOS AGRÍCOLAS

As fitas teste desenvolvidas para a detecção de aflatoxinas foi elaborada no formato competitivo, conforme ilustrado na Figura 32. Nesse formato, o resultado positivo é caracterizado pela presença de uma única linha vermelha na região controle do teste. Contrariamente, se a amostra analisada não possui aflatoxina ou está abaixo do limiar de detecção do teste, o resultado é caracterizado pela presença de duas linhas vermelhas, uma situada na região teste e a outra na região controle.

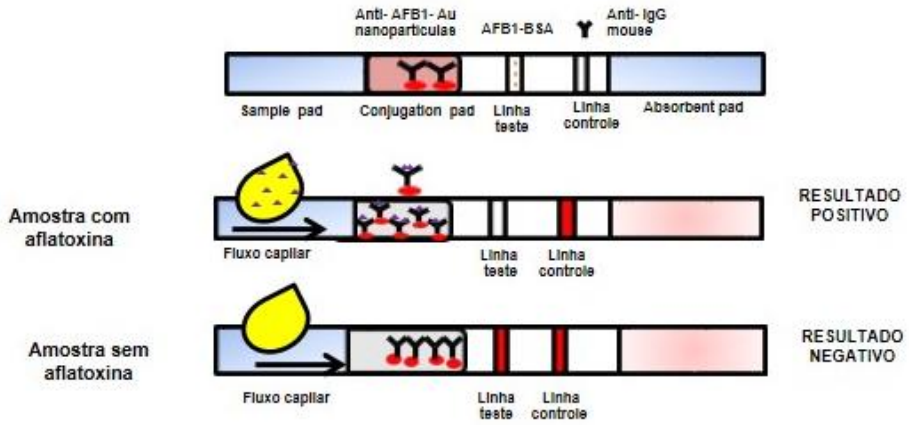



**FIGURA 32: Representação esquemática do formato e princípios do teste desenvolvido para a detecção de aflatoxinas.**

A concentração do anticorpo α-AFLA 3B6 utilizada para a conjugação com as nanopartículas de ouro coloidal foi determinada em 150 μg/mL, seguindo os mesmos procedimentos anteriormente descritos para os anticorpos anti-Cry 1Ac. O volume adsorvido no conjugate pad foi de 5 μL. Cada fita é adsorvida com 0.5μL, o que equivale a aproximadamente 0,38μg do conjugado por fita. A concentração final de $AFB_1$-BSA, utilizado na produção das fitas teste, foi obtida através da adsorção, nas membranas de nitrocelulose, de diferentes quantidade do antígeno: 0,5 μg, 0,25 μg e 0,05 μg. Os resultados foram obtidos através de ensaios diretos de detecção, utilizando $AFB_1$ comercial na concentração de 5 ng/mL (Figura 33).

A linha teste com a quantidade de 0,125 μg apresentou maior sensibilidade para a detecção de $AFB_1$, apresentando apenas uma linha vermelha na região controle, caracterizando resultados positivo. As amostras 0,5 μg e 0,25 μg apresentaram duas linhas vermelhas, uma na região teste e a outra na região controle, caracterizando resultados falsos-negativos, visto que a

amostra continha $AFB_1$. Por isso a quantidade de 0,125 μg foi padronizada para a produção dos testes de fluxo lateral.

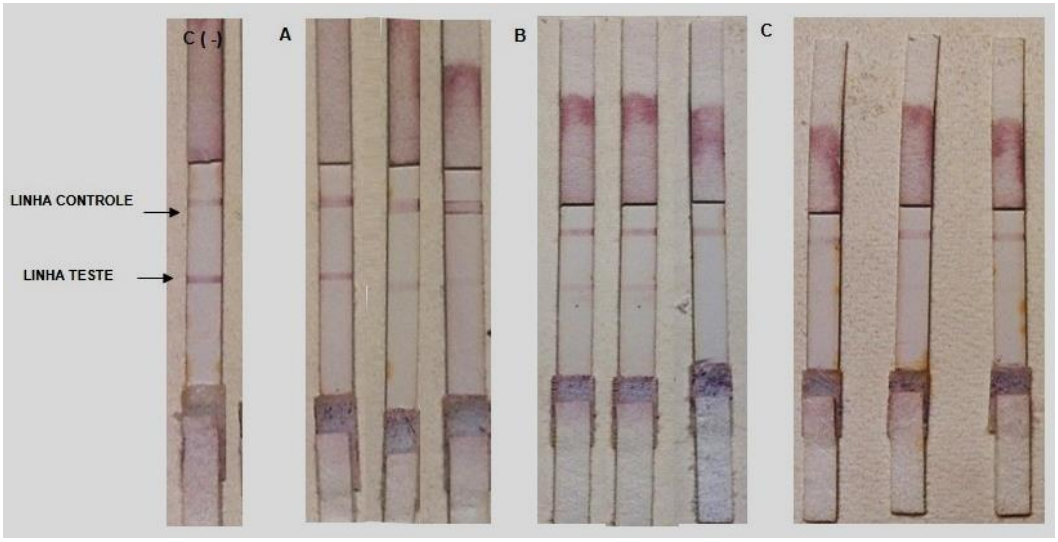



**FIGURA 33: Padronização do antígeno $AFB_1$-BSA na linha teste.** Foram utilizados para a produção do teste: 0,5 μg do anticorpo anti-mouse IgG na linha controle e 0,38 μg do anticorpo α-AFLA 3B6 conjugado com nanopartículas de ouro coloidal (40 nm) no conjugate pad. **A**- Adsorvido 0,5 μg do antígeno $AFB_1$-BSA na linha teste. **B**- Adsorvido 0,25 μg do antígeno $AFB_1$-BSA na linha teste. **C-** Adsorvido 0,125 μg do antígeno $AFB_1$-BSA na linha teste. Todas as análises (exceto o controle negativo) foram realizadas utilizando 5 ng/mL de $AFB_1$ adquirido comercialmente. C(-) = Controle negativo (PBS pH= 7,4).

A acurácia das fitas teste foi determinada através de ensaios de detecção direta de aflatoxinas sobre grãos de soja artificialmente contaminados com o fungo aflatoxigênico *A. flavus* (Figura 34). Como demonstrado, as amostras não contaminadas apresentaram resultados negativos, caracterizados pela presença de duas linhas vermelhas, uma na região teste e a outra na região controle. Diferentemente, as amostras contendo aflatoxinas foram identificadas como positivas, sendo caracterizadas pela presença de uma única linha vermelha, na região controle do teste.

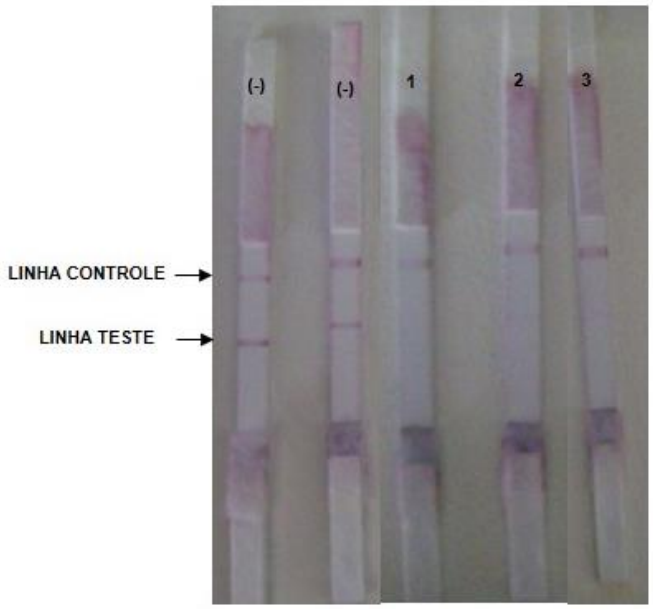



**FIGURA 34: Detecção de aflatoxinas, através dos testes de fluxo lateral, em grãos de soja contaminados.** 100 g de grãos de soja (BR-16) inoculados com (2,32 x) foram mantidos no escuro à 25ºC durante 14 dias. Em seguida, 25 g de farinha de soja foram solubilizadas em solução de extração (metanol/PBS, na proporção de 7:3 v/v), agitadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e alíquotas de 1 mL foram posteriormente diluídas em 4 mL de PBS (0,27μg/mL). Alíquotas de 200 μL foram dispensadas em placas de 96 poços e adicionado as fitas teste. (-) Grãos de soja inoculados com solução salina. 1, 2 e 3: Análise em triplicata dos grãos de soja inoculados com *A.flavus.*

A sensibilidade das fitas teste foi estabelecida, através de diluições do extrato de soja, proveniente dos grãos contaminados pelo fungo *A. flavus.* A concentração inicial foi determinada em 0,27μg/mL através do kit comercial de ELISA (RIDASCREEN ®). Após diluições, as concentrações finais foram estimadas em: 2,5 ng/mL, 0,5 ng/mL e 0,1 ng/mL. Como demonstrado na Figura 35, as fitas teste apresentaram limite mínimo de detecção de 0,5 ng/mL. Visto que, ao ser avaliada na concentração de 0,1 ng/mL a fita-teste apresentou resultados falsos-negativo. O perfil dos testes nessa concentração foi similar ao controle negativo, realizado na ausência de aflatoxinas.

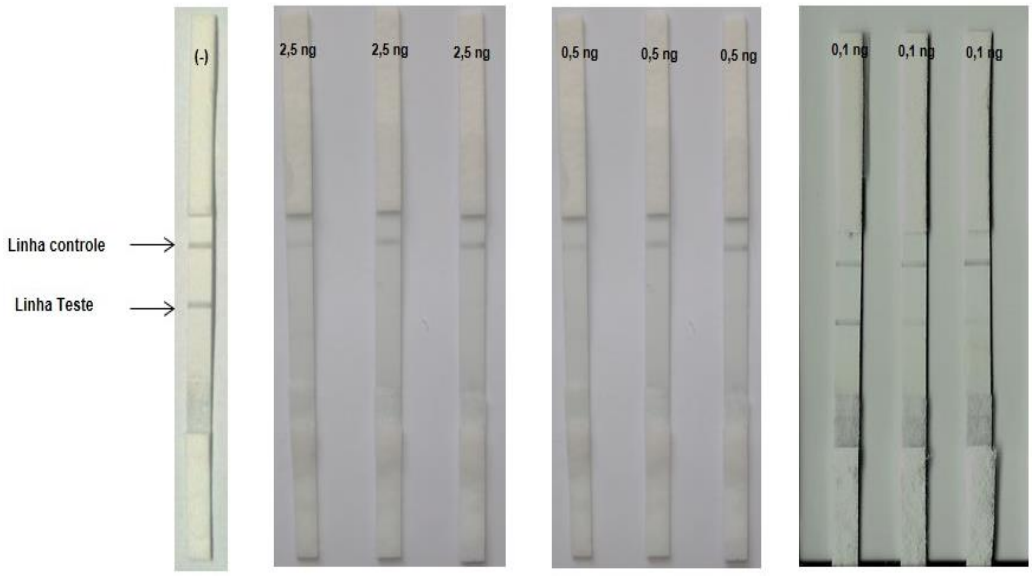



**Figura 35: Determinação da sensibilidade dos testes de fluxo lateral para a detecção de aflatoxinas em extratos de soja contaminados com *A.flavus*.** Extratos de soja contendo aflatoxinas totais (0,27µg/mL) foram diluídos em PBS para as concentrações de 2,5 ng/mL e 0,5 ng/mL. (-) controle negativo (PBS, pH 7,4)

Os ensaios de validação dos testes de fluxo lateral foram realizados utilizando os produtos comerciais: leite de soja e proteína texturizada de soja. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 4

**Tabela 4. Detecção de aflatoxinas em produtos alimentícios derivados da soja, produzidos e comercializados no Brasil, em 2014.**

| Produtos derivados da soja | Resultados Negativos | Resultados Positivos | Concentração de aflatoxinas † |
|---|---|---|---|
| Leite de soja | 6 ( 33,33%) | 12 (66,66%) | 1,77 ng/mL ± 0,508<br>1,35 ng/mL ± 0,508<br>2,28 ng/mL ± 0,508<br>0,96 ng/mL ± 0,508<br>2,05 ng/mL ± 0,508<br>2,13 ng/mL ± 508 |
| Proteína de soja | 2 ( 11,11%) | 16 (88,80%) | 4,04 µg/Kg ± 1,024<br>1,49 µg/Kg ± 1,024<br>1,69 µg/Kg ± 1,024<br>2,58 µg/Kg ± 1,024<br>1,73 µg/Kg ± 1, 024<br>3,28 µg/Kg ± 1,024 |
| **Total** | **8** | **28** | |

† Foram avaliados um total de seis lotes para cada produto alimentício, realizado a quantificação em triplicata. A média, com o desvio padrão para cada lote está representado na coluna

Foram realizadas trinta e seis análises, desses 66,66% foram positivos para amostras de leite de soja e 88,8% para amostras de proteína de soja texturizada. Os resultados positivos foram confirmados e quantificados através do kit comercial de ELISA, utilizando a curva padrão previamente estabelecida ($y= 0,0943x+0,0171$, $R^2= 0,9742$). Dos vinte e oito resultados positivos, quanto à presença de aflatoxinas, doze foram obtidos em amostras de leite de soja, 42,86%. Dessas amostras, a concentração média de toxinas foi de 1,756 ng/mL com desvio padrão de ±0,508 ng/mL. Dezesseis amostras positivas referentes as análises de proteína de soja texturizada (57,14% do total de resultados positivos), apresentaram um concentração média de aflatoxinas de 2,468 µg/kg, com variação de ± 1,024 µg/kg.Embora todos os resultados confirmem a presença de aflatoxinas, os valores obtidos estão dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira, que é de 5µg/Kg ou 5 ng/mL para produtos derivados

de grãos. Esses percentuais são estabelecidos e fiscalizados pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura e Pecuária

# 5. DISCUSSÃO

Os testes de fluxo lateral, são ferramentas analíticas simples, de diagnóstico rápido, que podem ser realizados em campo, sem a necessidade de uma infra- estrutura laboratorial. Essas vantagens, explicam a sua utilização nas mais diversas áreas de pesquisa, como na identificação clínica de certos marcadores moleculares para o câncer, no diagnóstico de doenças cardiológicas, na detecção de microorganismos infecciosos (Dias et al., 2003; Bührer-Sekula, 2008; Hang et al., 2009 ; Siebenhaar et al., 2010; Yonekita et al., 2013; Barnett et al., 2014). Recentemente, esses testes também têm sido aplicados na medicina veterinária (Nielsen et al., 2007), na agricultura (Santos et al., 2015) *e* na segurança alimentar (Ching et al., 2015).

A modernização da agricultura brasileira, nos últimos anos, tem permitido ao país, obter destaque no cenário internacional, como um dos maiores produtores e exportadores de alimentos do mundo. É inquestionável a importância do agronegócio para a sustentabilidade da economia do país. Visto que, nos últimos anos tem sido o principal responsável pelos superávits da balança comercial brasileira (Cepea, 2014). A utilização dos cultivares biotecnológicos ou GM, tem contribuído significativamente para esse cenário, visto que, além de melhorar a produtividade agrícola, também adicionou valor agregado, segurança e qualidade aos seus produtos. No entanto, as exigências quanto à adequação dos produtos agropecuários às legislações internacionais têm sido um dos gargalos para ampliar a participação do agronegócio na economia do país, pois exige a implementação de um sistema de rastreabilidade

agrícola eficiente. Esse processo assegura a conformidade dos produtos em cada etapa do percurso na cadeia produtiva, que inclui a aquisição de grãos certificados, produção em campo, transporte e/ou processamento das matérias primas básicas. Todas essas etapas precisam ser monitoradas por técnicas adequadas que garantam a identidade e qualidade dos produtos. Para as análises, em larga escala, dos grãos, a técnica convencional é a PCR, utilizada rotineiramente nas etapas de transporte para os países importadores. Por outro lado, para as análises em campo são necessários métodos de fácil manipulação e interpretação, que não necessitem de estruturas laboratoriais sofisticadas ou de especialistas para a sua execução. Além disso, também devem ser economicamente viáveis para o produtor. Nesse contexto, os testes de fluxo lateral surgem como ferramentas analíticas atrativas que atendem perfeitamente a esses requisitos. Atualmente, as fitas teste disponíveis para a certificação dos produtos GM, são importadas e onerosas para o agricultor brasileiro. Além disso, são específicas para eventos já comercializados internacionalmente.

Os principais produtos agrícolas, produzidos no país, provenientes de cultivares transgênicos são: a soja, o milho e o algodão. A proteína Cry1Ac é expressa nos principais eventos do algodão GM, utilizados no país: Bollgard I®, BollgardI RR® e Bollgard II®, todos produzidos e comercializados pela empresa Monsanto. Esses cultivares conferem resistência as principais pragas da cotonicultura mundial, causada por insetos da ordem leptóptera, no entanto, a mesma eficiência não tem sido observada, no ataque da principal praga da cotonicultura brasileira, o inseto da ordem coleóptera, *A. grandis,* popularmente conhecido como bicudo do algodoeiro. Diante disso, o laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, localizado na EMBRAPA-CENARGEN- Brasília/DF,

vem desenvolvimento estratégias moleculares, utilizando proteínas *Bt*, para o desenvolvimento de um novo cultivar GM, resistente do bicudo do algodoeiro. Oliveira et al., 2011, através das técnicas combinadas de Phage display e DNA *shuffling,* obtiveram a proteína mutante Cry8Ka5, que apresentou letalidade significativa contra larvas do bicudo. Por isso, o gene *cry8ka5* tem sido utilizado, como ferramenta molecular para a transformação do algodão.

No presente trabalho, foi desenvolvido um teste de fluxo lateral com aplicabilidade agrícola, para a detecção de cultivares transgênicos, expressando as proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5. Para isso foram produzidos dois anticorpos monoclonais 1B1 e 5H4 contra a proteína Cry1Ac. Esses anticorpos apresentaram reação cruzada com a toxina Cry8Ka5, sugerindo que reconhecem regiões similares em ambas as proteínas. De acordo com os resultados obtidos no mapeamento dos epitopos, o anticorpo 1B1 reconheceu a região peptídica PT4D (IIRAPMFSWIHRSAE) com maior afinidade, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$), quando comparado aos demais anticorpos. Quando essa sequência foi alinhada com outras proteínas Cry, apresentou identidade de 59% com a toxina Cry8ea1 (IRNPDVPVFSWTHRSAD). Essa sequência quando comparada a proteína Cry8Ka5 (número de acesso:JC265323), resultou em 60% de identidade (VPVFSWTHRS). Através do alinhamento dessa sequência com o peptídeo PT4d foi possível identificar a região: FSWIHS, como sendo idêntica entre as toxina Cry1Ac e Cry8Ka5. Apesar da identificação dessa região entre as duas proteínas, não é possível afirmar que essa sequência seja o epitopo reconhecido pelo monoclonal 1B1 na proteína Cry8Ka5, visto que, as análises de predição de imunogenicidade, não apresentaram determinantes antigênicos para essa

sequência. Por outro lado, o anticorpo 5H4 apresentou maior afinidade pela região PT5D (GTEFAYGTSPNL), apresentando níveis de significância de (α= 0,05), quando comparado aos demais anticorpos. As mesmas análises de bioinformática foram realizadas para esse peptídeo, no entanto, nenhuma similaridade foi identificada em outras proteínas Cry. Avaliações *in silico,* da sequência da proteína Cry8Ka5 identificou 26 determinantes antigênicos, porém, nenhuma dessas regiões foi identificada nos peptídeos utilizados nesse estudo. Esses resultados sugerem que a região ligação dos anticorpos monoclonais, 1B1 e 5H4 com a proteína Cry8Ka5 esteja localizada em áreas conservadas entre essas duas proteínas (Schnepf et al., 1998 e Maagd et al.,2001).

Um outro teste de fluxo lateral para a detecção de aflatoxinas em grãos ou em produtos derivados foi desenvolvido nesse trabalho. Para isso, foram produzidos anticorpos monoclonais contra a $AFB_1$. Essa toxina é a molécula predominante e também a mais carcinogênica entre os membros dessa classe. Por isso foi utilizada como antígeno, nas etapas de imunização. No entanto, por ser um hapteno (moléculas imunogênicas de baixa massa molecular) foi necessário utilizar a toxina conjugada com a proteína BSA, durante os procedimentos de imunização. Apesar da importância da proteína carreadora para obtenção de uma resposta humoral, a utilização de haptenos conjugados pode proporcionar a produção de anticorpos contra a região de ligação (Clementi et al., 1991). Diante disso, nesse estudo, os ensaios de ELISA, para avaliação da sorologia dos animais quanto para a seleção dos hibridomas positivos foram realizados utilizando a proteína BSA como controle negativo. Todos os anticorpos monoclonais obtidos apresentaram especificidade para o antígeno $AFB_1$ quando comparado aos resultados obtidos para a proteína BSA. Os

anticorpos α-AFLA: 3A5 e 3B6 apresentaram reatividade cruzada com $AFB_2$, $AFG_1$, $AFG_2$ e $AFM_1$. Essas micotoxinas apresentam características químicas similares, constituindo um grupo de compostos, altamente oxigenados e heterocíclicos (Bbosa et al., 2011). Por isso, anticorpos contra esses compostos apresentam elevados percentuais de reatividade cruzada entre os demais membros constituintes (Kosolova et al. 2006, Cervino et al. 2008, Sung-Hee et al.2011, Jiang et al. 2013). O anticorpo 3B6 apresentou maior sensibilidade (< $Ic_{50}$) e menor especificidade (>% reação-cruzada) quando comparado ao anticorpo 3A5, por isso foi selecionado para o desenvolvimento do respectivo testes de fluxo lateral. Embora, a especificidade de um anticorpo seja uma característica importante para o desenvolvimento de testes imunológicos, visto que reduz a possibilidade de resultados falsos positivos, a utilização do anticorpo 3B6 nos testes de fluxo lateral, garante a detecção de aflatoxinas totais, reduzindo significativamente a possibilidade de resultados falsos-negativos no teste desenvolvido.

Os testes de fluxo lateral são constituídos por quatro segmentos: sample pad, conjugate pad, membrana de nitrocelulose e absorbent pad. Essas partes são montadas sobre um cartão de suporte utilizando o sistema de pressão adesiva. A membrana é a região analítica do teste, na qual ocorrem a separação dos componentes da amostra e onde ocorrem as interações antígeno-anticorpo, em regiões denominadas de linha teste e linha controle. A membrana utilizada predominantemente nos testes é constituída por polímeros de nitrato de celulose (ou nitrocelulose). Embora outros tipos de membranas tenham sido avaliadas, os resultados não foram satisfatórios, incluindo membranas de PVDF e nylon Brendan O'' Farell, 2009. As membranas de nitrocelulose são extremamente

funcionais, embora não sejam a matriz ideal para as reações analíticas, esse material tem sido utilizado durante muitos anos com sucesso no desenvolvimento de testes rápidos. Características que incluem: preço acessível, porosidades que favorecem o fluxo capilar e elevada capacidade de adsorção de moléculas, justificam sua utilização no desenvolvimento dos testes imunocromatográficos. A principal desvantagem está relacionada a baixa reprodutibilidade de performance dentro e entre lotes das membranas produzidas, além disso, apresenta elevada umidade o que diminui a estabilidade dos materiais adsorvidos. Nesse estudo, as membranas adsorvidas foram tratadas com soluções de bloqueio antes da junção dos demais materiais constituintes dos testes de fluxo lateral, visando aumentar a estabilidade dos imunoreagentes e consequentemente o tempo de utilização dos testes. Outro fator importante está relacionado a velocidade do fluxo capilar da membrana de nitrocelulose, visto que, afeta diretamente a sensibilidade do teste. Membranas muito porosas aumentam a velocidade de migração, no entanto, diminuem a sensibilidade do teste. Por outro lado, membranas pouco porosas aumentam o tempo de migração, favorecendo o contato com os imunoreagentes e aumentando a sensibilidade, porém, dependendo do tipo do anticorpo utilizado, essa diminuição do fluxo pode favorecer reações inespecíficas e produzir resultados falsos-positivos. Atualmente, as membranas de nitrocelulose disponíveis comercialmente, apresentam uma faixa de velocidade de fluxo capilar, entre 60-240 segundos/4cm. Para os testes desenvolvidos nesse trabalho, foi utilizado a membrana de nitrocelulose HF135 (Milipore Merck, USA), com fluxo intermediário, de aproximadamente 150 segundos/4cm. Além disso, nesse estudo foi utilizado anticorpos monoclonais, caracterizados por

apresentarem elevada especificidade e afinidade pelo antígeno alvo. Embora, anticorpos policlonais imuno específicos apresentem propriedades semelhantes, a ausência de reprodutibilidade dessas moléculas, mesmo padronizando fonte animal, constitui o principal impedimento para sua utilização na produção dos teste de fluxo lateral.

Anticorpos monoclonais (AMocs) podem ser definidos como moléculas de especificidade única, produzidas a partir da imortalização de uma célula B *in vitro* (Nelson et al.,2000). A produção desses anticorpos envolve cinco etapas: (1) imunização, (2) fusão e seleção, (3) *screening* e dos hibridomas, (4) clonagem e caracterização (5) Produção *in vitro* ou *in vivo.* Na imunização, os antígenos são disponibilizados para o sistema imune do animal, na forma de emulsão, utilizando adjuvantes. Nesse estudo foi utilizado o adjuvante completo de Freund's (CFA) nas primeiras imunizações e nas doses subsequentes o Adjuvante Incompleto de Freund's (IFA). De maneira geral, os adjuvantes atuam prolongando o tempo de exposição do antígeno para o sistema imune, através do recrutamento das células que aumentam a fagocitose, a secreção de citocinas e a subsequente ativação e proliferação de células apresentadoras de antígenos (APC) (Billiau, A & Matthys,P, 2001). O CFA possui na sua composição Mycobaterium *ssp*, que aumenta substancialmente o recrutamento de células APC para o local da infecção, favorecendo a ativação e maturação dos receptores MHC II. Como consequência ocorre aumento na migração dessas células para os nódulos linfáticos e o subsequente reconhecimento por linfócitos T CD4, que atuam ativando macrófagos e principalmente células B, induzindo a resposta humoral (Murphy, K, Travers, P & Walport, M, 2010; Awate, S, Babiuk, L.A & Mutwiri, G, 2013). Comumente é necessário entre 3 e 4 doses, com

intervalos de 2-3 semanas, para obtenção de um resposta humoral, com títulos elevados de anticorpos específicos. Além disso, após a primeira imunização cada dose subsequente favorece a troca de classe da imunoglobulina, inicialmente IgGM e depois IgG.

A próxima fase na produção dos anticorpos monoclonais, consiste na formação dos hibridomas, a partir da fusão das células B, obtidas a partir do baço dos animais imunizados, com as células de mieloma histocompatíveis. Atualmente, são disponibilizados comercialmente as linhagens celulares: Sp2/0, NS1, NOS e X63Ag8, não havendo vantagens adicionais entre uma ou outra linhagem. Essas linhagens foram desenvolvidas com uma mutação no gene *hgprt*, conferindo uma deficiência na produção da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT). Essa enzima é essencial para via alternativa de síntese de nucleotídeos, logo, essas linhagens utilizam apenas a via comum para sua sobrevivência. Essa característica é essencial para os processos de seleção dos hibridomas. Visto que células normais podem utilizar as duas vias para a síntese de nucleotídeos, tanto a via comum como a via alternativa. Na produção dos hibridomas, as células B são fusionadas com as células de mieloma *hgprt* $^{(-/-)}$, formando células híbridas. Durante esse processo é necessário remover células de mieloma não fusionadas, visto que, impedem o crescimento dos hibridomas. Para isso, é adicionado ao meio de cultura o agente de seleção HAT (Hipoxantina, aminopterina e timidina), no qual a aminopterina atua impedindo a utilização desses nucleotídeos pela via normal, dessa forma as células *hgprt* $^{(-/-)}$ não sobrevivem. Células híbridas conseguem utilizar a via alternativa, devido a presença da enzima HGPRT providenciada pelas células B.

A etapa de *screening* é caracterizada pela identificação dos hibridomas que secretam anticorpos específicos para o antígeno alvo. O método de *screening* primário da cultura é a técnica de ELISA. Essas avaliações são realizadas a cada troca do meio de cultura, visto que, alguns hibridomas apresentam crescimento lento, passando a secretar os anticorpos entre 25 e 30 dias após a fusão (Nelson et al.,2000). Apenas os hibridomas positivos e estáveis são expandidos em cultura e utilizados para as etapas posteriores.

A etapa essencial na produção dos anticorpos monoclonais é a clonagem. Através desse procedimento é possível isolar um única célula, secretora de um anticorpo com especificidade e afinidade peculiar. Esse processo é realizado através de diluições limitantes que garante a produção de um anticorpo exclusivo por cada clone secretor. Para certificar a eficiência do procedimento de clonagem, os sobrenadantes das culturas são caracterizados quanto à subclasse IgG, através da isotipagem dos anticorpo monoclonais. Nesse estudo, cada clone secretor foi avaliado e os resultados confirmaram a eficiência da clonagem na produção dos anticorpos monoclonais.

Os anticorpos monoclonais obtidos nesse trabalho foram produzidos *in vivo*, através da técnica de ascite, que consiste na inoculação dos respectivos clones secretores, na cavidade peritoneal de camundongos. Inicialmente, esses animais são tratados com pristane, que atua estimulando o recrutamento de macrófagos para o local da aplicação. Em seguida, os hibridomas são inoculados, resultando em um processo inflamatório (ascite), através do qual os hibridomas são rapidamente expandidos, liberando na cavidade peritoneal, elevadas concentrações de anticorpos monoclonais. Apesar da possibilidade de obter anticorpos monoclonais por métodos *in vitro*, essa técnica não pode ser

estendida para todos os hibridomas, visto que, cada linhagem responde de maneira diferente aos métodos de produção *in vitro,* podendo em alguns casos, não se adaptar as condições em cultura. Além disso, durante os procedimentos *in vitro* podem ocorrer desnaturação proteica e diminuição da efetividade da imunoglobulina (National Academy Press, 1999). Outra desvantagem dos métodos *in vitro* está relacionada ao elevado custo financeiro, quando comparado ao método *in vivo* para a produção de anticorpos monoclonais em pequena e/ou média escala.

Para o desenvolvimento dos testes de fluxo lateral, os anticorpos α-Cry 1B1 e α-AFLA 3B6 foram marcados com nanopartículas colorimétricas de ouro coloidal (40 nm) e em seguida adsorvidos na membrana de sílica (ou fibra de vidro), resultando na formação do conjugate pad. Recentemente, lipossomos tem sido utilizados no desenvolvimento de testes de fluxo lateral (Wen et al., 2005; Edwards, K.A & Baeumner, .A.J, 2009).Sua utilização está diretamente relacionada com a capacidade de encapsular grandes concentrações de moléculas colorimétricas ou fluorimétricas, resultando no aumento da sensibilidade dos testes de 2 a 3 ordens de magnitude. No entanto, esse sistema apresenta algumas desvantagens, principalmente quanto a instabilidade e suscetibilidade da molécula a lise, como resultado da ação de surfactantes, comumente utilizado em tampões de extração de materiais biológicos (Chun, P, 2009). As nanopartículas de ouro coloidal são os marcadores mais utilizados na produção dos testes de fluxo lateral. As principais razões incluem: a facilidade e rapidez na obtenção das nanopartículas, baixo custo para a produção, as partículas apresentam coloração intensa, não há necessidade de procedimentos posteriores para a visualização, os protocolos para a produção e conjugação já

são bem caracterizados e além disso, essas moléculas são estáveis tanto em suspensão quanto após secagem. Essas nanopartículas coloidais são constituídas pelo elemento ouro central envolto por uma carga positiva e uma dupla camada iônica. Elevadas concentrações de eletrólitos, em soluções coloidais, resultam na floculação das nanopartículas e perda da coloração vermelha, tornando a solução azul. A alteração na coloração é decorrente da repulsa eletrostática das cargas entre as nanopartículas e os eletrólitos (Chun, P, 2009). Por isso é importante, controlar o pH do ligante e da solução de ouro coloidal durante o processo de conjugação. Valores de pH entre 7,5-9,0 são comumente utilizados na conjugação dos anticorpos com as nanopartículas de ouro coloidal. Outro aspecto importante na conjugação com nanopartículas, está relacionado a concentração do ligante, visto que, em concentrações elevadas podem alterar a estabilidade da solução, resultando na floculação das nanopartículas. Por isso, é necessário estabelecer, previamente, a concentração necessária do ligante. Para a conjugação dos anticorpos α-Cry1Ac e α-$AFB_1$ foi estabelecido a concentração de 130 μg/mL, no entanto, para a conjugação é necessário utilizar um excesso do ligante na ordem de 10-20%. Por isso nesse estudo nós utilizamos a concentração de 150 μg/mL para os conjugados. Esse percentual não interfere na estabilidade das partículas e são posteriormente removidas durante as etapas de centrifugação. Após o acoplamento, é necessário, utilizar compostos contendo polióis (por exemplo polietilenoglycol) ou proteínas (por exemplo BSA) para estabilizar os conjugados.

Os testes de fluxo lateral desenvolvidos nesse estudo foram avaliados quanto a sensibilidade, ou seja, a capacidade de detectar corretamente amostras positivas e quanto a sua especificidade, ou seja, a capacidade do teste em

detectar amostras verdadeiramente negativas (Altman, 1991). O teste desenvolvido para a detecção das proteínas: Cry1Ac e Cry8Ka5 expressas em cultivares transgênicos, apresentou 100% de especificidade na detecção de folhas de algodão não GM, ou seja, realmente negativas. De acordo com Siebert et al., 2009, os níveis de expressão da proteína Cry1Ac em tecidos foliares jovens de cultivares transgênicos, foi estimado em 2,98 μg/ g de tecido seco. Nos ensaios de validação dos testes foi utilizado 100 mg de tecido seco, para a obtenção de proteínas totais, tanto em folhas GM quanto não-GM. Após os procedimentos de extração, a concentração das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5, utilizando como referência o trabalho de Siebert et al., 2009, foi estimada em 0,298 μg/mL. Para a validação das fitas teste, foi utilizado 200 μL dessa solução, o que equivale a aproximadamente 0,06 μg das proteínas Cry1Ac e Cry8Ka5, nos cultivares Bollgard® I e planta 50 da EMBRAPA, respectivamente. Esses valores quando comparados aos obtidos através da curva padrão, estabelecida nesse trabalho (0,05μg) não apresentam diferença significativa. Os resultados demonstraram que o teste foi capaz de identificar corretamente os cultivares GM dos não GM, sugerindo elevada sensibilidade e especificidade na detecção de acordo com os parâmetros descritos por Altman, 1991.

Os testes desenvolvidos para a detecção de aflatoxinas foram validados *in vitro* através de experimentos utilizando grãos de soja contaminados pelo fungo *A. flavus.* Esse fungo foi classificado como possuindo esclerótia S (Grupo II) e gentilmente cedido pelo professor Edivaldo Ximenes, da Universidade de Brasília, DF. Esses fungos são classificados quanto a esclerotia em S e L. Tanto cepas S quanto L produzem aflatoxinas $B_1$ e $B_2$, no entanto, apenas cepas S, produzem também aflatoxinas $G_1$ e $G_2$ (Amaike & Keller, 2011). Embora *A.*

*parasitucus* produzam aflatoxinas B e G, esses fungos, geralmente, apresentam-se limitados a certas culturas agrícolas, por fatores ambientais ainda não estabelecidos. Contrariamente, *A.flavus* infectam uma diversidade de culturas, principalmente, oleaginosas, incluindo a soja (Amaike & Keller, 2011). Como o país é o principal produtor e exportador do complexo- soja do mundo, a contaminação desses grãos por aflatoxinas tem causado perdas significativas na produção agrícola do país. Por isso, nos ensaios de validação, foram utilizados grãos de soja contaminados, assim como, produtos alimentícios derivados da soja. Os resultados demonstraram que o teste produzido foi capaz de detectar com elevada sensibilidade e especificidade amostras de soja contaminados por aflatoxinas. Além disso, esses testes apresentaram sensibilidade de 0,5 ng/mL ou 0,5 μg/Kg. Esses valores são inferiores aos limites permitidos pelo país, que é de 5μg/Kg e aos estabelecidos para a União Européia que é de 2μg/Kg.

Os testes de fluxo lateral desenvolvidos nesse estudo atendem a uma importante demanda do agronegócio brasileiro relacionado a rastreabilidade agrícola do país, visto que possibilita a certificação dos produtos agrícolas produzidos no país com eficiência e baixo custo para o agricultor. Além disso, será o primeiro do mercado para a detecção do novo cultivar de algodão GM produzido exclusivamente no Brasil. Sob o aspecto técnico, esse estudo contribuiu significativamente para o aperfeiçoamento de recursos humanos na área da produção de kits diagnósticos destinados a agricultura.

## 6. CONCLUSÕES

1. Os cinco anticorpos monoclonais α-Cry1Ac produzidos nesse estudo foram predominantemente classificados como pertencentes a subclasse IgG2b e apresentaram significativa reatividade cruzada ($p<0,05$) contra a proteína Cry8Ka5, com exceção do anticorpo 2E3;

2. Os anticorpos monoclonais α-Cry1Ac 1B1 e 5H4 reconhecem epitopos distintos da proteína Cry1Ac, quando comparado aos demais anticorpos anti-cry1Ac avaliados ($p<0,05$). Por isso foram selecionados para o desenvolvimento dos TFLs.

3. Os TFLs desenvolvidos nesse estudo para a detecção das proteínas Cry1Ac e Cr8Ka5 apresentaram sensibilidade *in vitro* de 0,5 μg/μL. Além disso, foram capazes de distinguir eficientemente amostras de extratos proteicos, proveniente de folhas de algodão GM, de extratos proveniente de folhas do cultivar convencional (não GM);

4. Os seis anticorpos monoclonais α-AFLA obtidos nesse estudo apresentaram especificidade contra a toxina AFB1. Além disso, foram predominantemente classificados como pertencente a subclasse IgG1, exceto os anticorpos 3A5 e 3B6 que apresentaram maior especificidade ($p<0,05$) e foram classificados como IgG3;

5. O anticorpo 3B6 apresentou maior reatividade cruzada contra as aflatoxinas análogas: $AFM_1>AFG_1>AFG_2>AFB_2$. Por isso foi selecionado para o desenvolvimento dos TFLs.

6. Os TFL para a detecção de aflatoxinas, desenvolvidos nesse estudo, demonstraram sensibilidade *in vitro* de 0,5 ng/mL. Além disso, foram capazes de distinguir eficientemente amostras de soja e/ou produtos derivados, contaminadas por essas toxinas, de amostras sem contaminação, ou com aflatoxinas, abaixo do *cut-off* de detecção das fitas teste.

7. Os testes de fluxo lateral desenvolvidos nesse estudo apresentaram elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizados como ferramentas analíticas sensíveis e de baixo custo para a rastreabilidade agrícola do país.

## REFERÊNCIAS

AHN, J.S; CHOI, S; JANG, S.H; CHANG, H.J; KIM, J.H; NAHM, K.B; OH, S. W, CHOI, E.Y. Development of a point-of-care assay system for high-sensitivity C-reactive protein in whole blood. **Clin Chim Acta.** (2003) 332:51–59

ALTMAN, D.G. Pratical Statistics for Medical Research (C & Hall, Ed). London Chapman &Hall, 1991.

ANVISA (National Health Surveillance Agency). RDC nº 7/2011 of 18 February 2011, DOU nº37 pp.72.

AMAIKE, S AND KELLER, N.P*. Aspergillus flavus.* **Annu. Rev. Phytopathol**. 2011. 49. P. 107–33.

BARNETT, J.M; WRAITH, P; KIELY, J; PERSAD, R; HURLEY, K; HAWKINS, P AND LUXTON, R. An inexpensive, fast and sensitive quantitative Lateral flow Magneto-Immunoassay for total prostate specific antigen. Biosensor. 2014. Sep; 4 (3). P. 204-220.

BARTON, K.A; WHITELEY H.R; YANG, K.S.*Bacillus thuringinesis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotianatobacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiol.1987**. 85**.** P**.** 1103-1109.

BbOSA, G.S; KITYA, D; ODDA, J AND OKENG-OGWAL, J. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. **Health.** 2013. 5(10A), 14-34.

BIING-HUI, L; YU-TIEN, H; CHUAN-CHEN, L; FENG-YIH, Y**.** Detecting aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip.**Food Control***.* 2013, 30, 184-189.

BILLIAU, A AND MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. J Leukocyte Biology. 2001. 70 (6).p. 849-860.

BLEY N' DEDE, C; JOLLY, C.M; VODOUCHE, S.D; JOLLY, P.E. Economic risks of aflatoxin contamination in marketing of Peneaut in Benin**. Economics Research International**. 2012. Doi:10.1155/2012/230638.

BRAVO, A; GILL, S.S; SOBERON, M. Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon.** 2007. Mar, 15, 49 (4).p. 423-435.

BRAVO, A; GÓMEZ, I; CONDE, J; MUNÕZ-GARAY, C; SANCHES, J; MIRANDA, R; ZHUANG, M; GILL, S.S; SÓBERON, M. Oligomerization triggers binding of a Bacillus thuringiensis Cry1Ab pore forming toxin to aminopeptidades N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochimica et Biophysica Acta. 2004. 1667. P. 38-46.

BRENDAN, O'FARELL. Evolution in Lateral Flow-based Immunoassay sytems. Lateral flow Immunoassay. 2009. P.1-33.

BROOKES, G. & BARFOOT, P. Biotechnology in Agriculture and the Food Chain.**GM Crops & Food**. 2013. **4:1**, 74-83.

BRUNE, P. D; A. H. CULLER; W. P. RIDLEY; K. WALKER. Safety of GM Crops: Compositional Analysis. **J. Agric. Food Chem.,** 2013. 61, 8243-8247.

BüHRER-SEKULA, S. PGL-1 Leprosy serology. **Rev.Soc. Bras. Med.Trop**. 2008. 41(2).p. 3-5

CEPEA- Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Perspectiva para o agronegócio em 2015. **Universidade de São Paulo,** SP, 2014.

CERVINO C, ASAM S, KNOOP D, RYCHLIK M, NIESSER R. Use of isotype-labeled aflatoxins for LC-MS/MS stable isotope dilution analysis of food. J.Agric. **Food Chem**. 2008. 56(6).p. 1873-1879.

CHING, K.H; XIAOHUA, HE; STANKER, L.H; LIN, A.V; McGARVEY, J.A AND HNASKO, R. Detection of Shiga Toxins by Lateral Flow Assay. **Toxins.** 2015. 7. P. 1163-1173.

CHUN, P. Colloidal Gold and other labels for lateral flow immunoassay. Lateral Flow Immunoassay.2009. p.75-93.

CLARK, B.W; PHILLIPS, T.A; COATS, J. R. E. Environmental Fate and Effects of Bacillus thuringiensis (Bt) proteins from Transgenic Crops: a Review. **J. Agric Food Chem.** 2005. 53, 4643−4653.

CLEMENTI, M.E; MARINI, S; CONDO, S.G AND GIARDINA, B. Antibodies against small molecules. Ann. 1st. Super. Sanitá.1991. 27(1).p. 139-144.

CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento safra Brasil Grãos. **ISSN- 2318-6852.** Jun 2015, 2 (9). P. 1-104.

DAVIS, N. D; DIENER, U. L AND EIDRIDGE D W. Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. **Appl. Microbiol**. 1966. 14:378-380.

DELMULLE, B.S, DE SAEGER, S.M.D.G, SIBANDA, L, BARNA-VETRO, I, VAN PETEGHEM, C.H Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B1 in pig feed. **J. Agric. Food Chem**. 2005. 53. P. 3364-3368.

DIAS, R; ARIZA, J; ALBEROLA, I; CASANOVA, A AND RUBIO, M.F. Secondary Serological Response of Patients with Chronic Hepatosplenic Suppurative Brucellosis. **Clin Vaccine Immunol.** 2006. 13 (11).p.1190-1196.

DILL G.M; JACOB C.A. & PADGETTE S.R. Glyphosate resistant crops: Adoption, use and future considerations. **Pest Manag. Sci**. 2008. 64. p. 326-31.

DONOVAN, W.P; ENGLEMAN, J.T; DONOVAN, J.C; BAUM, J.A; BUNKERS, G.J; CHI, D.J; CLINTON, W.P; ENGLISH, L; HECK, G.R; ILAGAN, O.M; KRASOMIL-OSTERFELD, K.C; PITKIN, J.W; ROBERTS, J.K; WALTERS, M.R. Walters Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Appl. Microbiol.Biotechnol.** 2006. 72. P. 713-719.

EDWARDS, K.A AND BAEUMNER, A.J. Liposome-Enhanced Lateral Flow Assay for the Sandwich-Hybridization detection of RNA. **Biosensors and Biodetection.** 2009. 504. P. 185-215.

FREDERICI, B.A. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. **J.Invertebrate Pathology**. 2005. 89. p. 30-38.

FISCHHOFF, D.A; BOWDISH, K.S; PERLAK, P.G. MARRONE, S.M; McCORMICK, J.G. NIEDERMEYER, D.A; DEAN, K; KUSANA-KRELZMER, E.J.

FUNKE, T; HUIJONG HAN; MARTHA L. HEALY-FRIED; MARKUS FISCHER; ERNST SCHÖNBRUNN. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **PNAS**. 2006. August 29, 103 (35). p. 13010–13015.

HÖFTE, H and WHITELEY, R. Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Microbiol. Rev. 1989. 53. P. 242-255.

GARCIA-ROBLES, I; SÁNCHEZ, J; GRUPPE, A; MARTINEZ-RAMIREZ, RAUSELL,C; REAL, M.D; BRAVO, A. Mode of action of Bacillus thuringiensis PS86Q3 strain in hymenopteran forest pest. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** 2001. 31. P. 849-856.

GARCZYNSKI, S. F. AND ADANG M. J. Interactions of Bacillus thuringiensis Cry1 toxins with lipids isolated from the midgut of Manduca sexta larvae. In Abstracts of the 29th Society for Invertebrate Pathology Annual Meeting and IIIrd International Colloquium on Bacillus thuringiensis. **Society for Invertebrate Pathology,** Cordoba, Spain.1996 p. 28.

GATEHOUSE, A.M.R; SHI, Y; POWELL, K.S;BROUGH, C; VAUGHAN, A.H; HAMILTON, W.D.O, NEWELL, C.A; MERRYWEATHER, A; BOULTER, D;

GATEHOUSE, J.A. Approaches to Insect Resistance using transgenic plants. **Philosophical Transactions B.** 1993. Nov, 342 (1301).p. 279-286.

GE, A.Z; PFISTER, R.M AND DEAN, D.H. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. **Gene**.1990. 93(1). Sep,01. P. 49-54.

GEOGHEGAN, W.D. The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold. **J. Hisochem. Cytochem**. 1988. 36. P. 401

GILL, S. S; COWLES, E. A. AND FRANCIS V. Identification, isolation, and cloning of a Bacillus thuringiensis CryIAc toxin-binding protein from the migut of the lepidopteran insects Helionthis virescens. **J. Biol.Chem.**1995. 270. P. 27277-27282.

GREEN, J.M & OWEN, M. D.K. Herbicide-Resistant Crops: Utilities and Limitations for Herbicide-Resistant Weed Management. **J Agric Food Chem.** 2011. Jun 8; 59(11). p. 5819–5829

GROSSI-DE-SA MF, OLIVEIRA GR, SILVA MCM, ROCHA TL, MAGALHÃES MTQ: INPI. Patent 012090001018. 2009.

GROTHAUS, G. D; BANBDLA, M; CURRIER, T; GIROUX, R; JENKINS, G.R; LIPP, M; SHAN, G; STAVE, J.W AND PANTELLA, V. Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. **J. AOAC INTERNATIONAL**. 2006. 89 (4).P. 913-928.

HANG, V.TY; NGUTEY, N.M; TRUNG, D.T; TRICOU, V; YOKSAN, S; DUNG, N.M; NGOC, T.V; HIEN. T.T; FARRAR, J; WILLS, B AND SIMMONS, C.P. Diagnostic Accuracy of NSA1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to viraemia and antibody responses. **PLoS Negl Trop Dis**. 2009. 3(1).

HAYAT, M.A.Colloidal gold: Principles, methods, and applications. **Academic Press, Inc.,** New York, 1989 ISBN 0–12–333927–8, Vol. I, 536 pages ISBN 0–12–333928–6, Vol. II, 484 pages.

HORRISBERGER, M; ROSSET, J. AND BAUER, H. Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in scanning electron microscopy. **Experimentia**.1975. 31. P. 11-47.

HÖFTE, H & WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. **Microbiol Rev**. 1989. 53 (2). P. 242-255.

IARC- International Agency for Research on Cancer (2002) Some mycotoxins, naphtalene and styrene, vol 82. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. World Health Organization, Lyon, pp 171–300

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crop: 2014. International **Service for the acquisitions of Agro-Biotech Applications**. 2014. 49.

JIANG W, WANG Z, NÖLKE G, ZHANG J, NIU L, SHEN J Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in Food Matrices by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Food Anal. Methods**. 2013. 6. P. 767-774.

JURAT-FUENTES, J.L & Adang, M.J. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae. **J. Invertebrate Pathol**. 2006. 92. P. 166-171.

KNIGHT, P. J. K., CRICKMORE, N. AND ELLAR, D. J. The receptor for Bacillus thuringiensis CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran Manduca sexta is aminopeptidase N. **Mol. Microbiol**. 1994. 11. P. 429-436.

KNOWLES, B.H and ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of Bacillus thuringiensis δ- endotoxins with different insect specificity. **Biochim. Biophys.Acta.** 1987. 924. P. 507-518.

KÖHLER G, MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. 1973. 256. P. 495-497.

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

LATEEF, S.S; GUPTA, S; JAYATHILAKA, L.P; KRISHNANCHETTIAR, S; HUANG, J-S; SHIANG-LEE, B. An improved protocol for coupling synthetic peptides to carrier proteins for antibody producing using DMF to solubilize peptides. **J. Biomol.Tech.** 2007. 18 (3). p. 173-176.

LEE N A, WANG S, ALLAN R D, KENNEDY I R. A Rapid Aflatoxin B1 ELISA: Development and Validation with Reduced Matrix Effects for Peanuts, Corn, Pistachio, and Soybeans **J. Agric. Food Chem**. 2004. 5. P. 2746−2755.

MAAGD, R. A; BRAVO, A, CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet**. 2001. 17:193–199.

MANETTA A.C (2011). Aflatoxins: Their Measure and Analysis: Detection, Measurement and Control. http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detection-measurement-and-control/aflatoxins-their-measureand-analys. Acessed 21january 2015.

MARROQUIN, L.D; ELVASSNIA, D; GRIFFITTS, J.S; FEITELSON, J.S; AROIAN, R.V. Bacillus thuringiensis ( Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutans in the nematode Caenorhabditis elegans. **Genetics**. 2000. 155. 1693-1699.

MAYER, D.E; ROCHESTER, S.G R; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnology**.1987. 5.p. 807-813.

MINTO, R.E AND TOWSEND, C.A .Enzymology and Molecular Biology of Aflatoxin Biosynthesis. **Chem.Rev.** 1997. 97. P. 2537-2555.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US). Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. Washington (DC): National Academies Press (US). 1999. ISBN-10: 0-309-07511-4ISBN-13: 978-0-309-07511-4ISBN-10: 0-309-51904-7

NELSON, P.N; REYNOLDS, G.M; WALDRON, E.E; WARD, E; GIANNOPOULOS, K AND MURRAY, P.G. Demystified Monoclonal antibodies. **Mol Pathol.** 2000. Jun, 53(3). P. 111-117.

NIELSEN, K; YU, W.L; KELLY, L; BERMUDEZ, R; RENTERIA, A.DAJER; GUTIERREZ,E; WILLIAMS, J; ALGIRE, J AND TORIONI DE ESCHAIDE, S. Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to *Anaplasma marginale.* **J. Immunoassay and Immunochemistry**. 2007. 29 (1).

OHBA, M; MIZUKI, E; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Research**. 2009. 29. 427-434.

OLIVEIRA, G.R; SILVA, M.C.M; LUCENA, W.A; NAKASU, E.Y.T; FIRMINO, A.P; BENEVENTI, M.A; SOUZA, D.S.L; GOMES-Jr, J.E; SOUZA-Jr. J.D.A; RIGDEN, D.J; RAMOS, H.B; SOCCOL, C.R AND GROSSI-DE-SÁ, M.F. Improving Cry8Ka5 toxin activity towards the cotton boll weevil *( Anthonomus grandis).* BMC Biotecnology. 2011. 11(85).p. 2-13.

OLIVEIRA, C.M; AUAD, A.M; MENDES, S.M; FRIZZAS, M.R. Crop losses and the economic impact of insect pest on Brazilian agriculture. Crop Protection. 2014. 56.p.50-54.

PALMA, L; MUÑOZ, D; BERRY, C; MURILLO, J; CABALLERO, P. Bacillus thuringiensis Toxins: An overview of their Biocidal activity. **Toxins.** 2014. 6. P. 3296- 3325.

PERLACK, F; OPPENHUIZEN, M; GUSTAFSON, K; VOTH, R; SIVASUPRAMANIAM, S; HEERING, D; CAREY, B; IHRIG, R.A AND ROBERTS, J.K. Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA early promises versus today's reality. **Plant J. 2001**. 26 (6). P. 489-501.

PIGOTT, C.R; KING, M.S & ELLAR, D.J. Investigating the Properties of Bacillus thuringiensis Cry proteins with novel loop replacements created using Combinatorial Molecular Biology. **Applied and Environment Microbiology**. 2008. June,74 (11). p. 3497- 3511.

PIGOTT, C.R and ELLAR, D.J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 2007. 71(2). P. 255-281.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A; KORF, J AND Van AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Anal. Bioanal.Chem**. 2009. 393. P. 568-582.

QIAN, S AND BAU, H.H. Analysis of Lateral Flow Bio-detectors: Competitive Format. **Analytical Biochemistry**. 2004, 326, 211–224.

SANGADALA, S., WALTERS, F. S., ENGLISH, L. H. AND ADANG, M. J. A mixture of Manduca sexta aminopeptidase and phosphatase enhances Bacillus

thuringiensis insecticidal CryIA(c) toxin binding and $86Rb^{+}$-$K^{+}$ efflux *in vitro*. **J. Biol. Chem.** 1994. 269, p. 10088-10092

SANTOS, V.O; PELEGRINI, P.B; MULINARI, F; MOURA, R.S; CARDOSO, L.P.V; BÜHRER-SÉKULA, S; MILLER, R.N.G; PINTO, E.R.C AND GROSSI-DE-SÁ, M.F. A novel immunocromatographic strip test for rapid detection of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins in genetically modified crops. **Analytical Methods**. 2015. DOI: 10.1039/c5ay02051d.

SHUNG-HEE K, SANG-HO C, BISCHOFF K, SUNG-WON P, SEONG-WAN S, HWAN-GOO K. Production of Group Specific Monoclonal Antibody to Aflatoxins and its Application to Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **Toxicol.Res.** 2011. 27.p. 125-131.

SIEBENHAAR, R; MUSHOLT, P.B; FORST, T; WEBER, M.M; PFüTZNER, A. Laboratory evaluation of a new lateral flow-based point-of-care rapid teste for assessment for of chronic systemic inflammation. **J Diabetes Sci Technol**. 2010. 4(3)3. P. 717-722

SIEBERT, M. W; PATTERSON, T. G; GILLES, G. J; NOLTING, S. P; BRAXTON, L. P; LEONARD, B.R. ; VAN DUYN, J. W AND LASSITER, R. B. Quantification of Cry1Ac and Cry1F Bacillus thuringiensis insecticidal proteins in selected transgenic cotton plant tissue types. **Journal of Economic Entomology.** 2009. 102. P. 1301-1308.

SCHNEPF, E; CRICKMORE, N; VAN RIE, J; LERECLUS, D; BAUM, J; FEITELSON, J; ZEIGLER, D.R AND DEAN, D.H. Baccilus thuringiensis and its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiol and Molecular Biology Reviews.** 1998. 62 (3). P. 775-806.

THOMAS, D.J; MORGAN, J.; WHIPPS, M; SAUNDERS, R. Plasmid transfer between Bacillis thuringiensis, subsp. israelensis strain in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. 2001. Appl.Environ.Microbiol. 67. P.330-338.

THOMAS, D.J; MORGAN, A; WHIPPS, M; SAUNDERS, R. Plasmid transfer between the Bacillus thuringiensis, subspecies kurstaki andtenebrians in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. Appl. Environ. Microbiology. 2000.66. p. 118-124.

VALAITIS, A. P., LEE, M. K., RAJAMOHAN, F. AND DEAN, D. H. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 1995. 25.p. 1143-1151.

WANG, X; TENG, DA; GUAN, QINGFENG; TIAN, F; WANG, J. Detection of genetically modified crops using multiplex asymmetric polymerase chain reaction and asymmetric hyperbranched rolling circle amplification coupled with reverse dot blot. **Food Chemistry**. 2014. 173. p. 1022-1029.

WEI, J.Z; HALE, K; CARTA, L; PLATZER, E; WONG, C; FANG, S.C; AROIAN, R.V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins the target nematodes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. 100. P. 2760-2765.

WEN, H-W; BOREJSZA-WYSOCKI, W; DeCORY, T.R AND DURST, R.A. Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 2005. 382 (5). P. 1217-1226.

YONEKITA, T; OHTSUKI, R; HOJO, E; MORISHITA, N; MATSUMOTO, T; AIZAWA, T AND MORIMATSU, F. Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli. **J.Microbiol.Methods**. 2013. 93 (3). P. 251-256.

ZHANG X, CANDAS M, GRIKO NB, TAUSSIG R, BULLA LA., JR. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*.**Proc Natl Acad Sci.** 2006; 103. p. 9897–9902

ZHANG, X; CANDAS, M; GRIKO, N.B; ROSE-YOUNG, L; BULLA, A, Jr. Cytotoxicity of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Cell Death Differ.** 2005. 12. P. 1407-1416.

## APENDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Analytical Methods

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Cite this: *Anal. Methods*, 2015, 7, 9331

# A novel immunochromatographic strip test for rapid detection of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins in genetically modified crops

Vanessa O. Santos,[ad] Patrícia B. Pelegrini,[d] Fernanda Mulinari,[b] Rodrigo S. Moura,[c] Ludimila P. V. Cardoso,[c] Samira Bührer-Sékula,[c] Robert N. G. Miller,[e] Eduardo R. C. Pinto[d] and Maria Fátima Grossi-de-Sá*[df]

Received 4th August 2015
Accepted 24th September 2015

DOI: 10.1039/c5ay02051d

www.rsc.org/methods

The cultivation of genetically modified (GM) crops has grown rapidly worldwide. This has led to regulatory authorities implementing strict procedures to monitor and verify the presence and abundance of GM varieties in agricultural crops. Immunochromatographic strip tests have been employed for the detection of transgenic proteins expressed in GM crops as rapid, reliable and cost-effective screening tools. In this study, we developed a novel and sensitive strip test assay, based on a sandwich format, for the identification of Cry1Ac and Cry8Ka5 transgenic proteins. We generated two monoclonal antibodies (mAb), namely 1B1 and 5H4, that bind with high specificity to Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins. For the development of strip tests, colloidal gold particles were coated with 1B1 mAb and used as the detector reagent. The 5H4 mAb was sprayed at the test line of a nitrocellulose membrane to serve as a capture reagent and anti-species specific antibodies were used at the control line. The strip test developed was capable of detecting 0.06 μg of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins. For validation of the strip test, GM and non-GM cotton leaf samples were employed. The results indicated that the strip test was capable of distinguishing between GM and non-GM cotton samples, offering potential for use as a rapid and cost-effective screening tool for insect-resistant GM crops expressing Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins to control lepidopterans and coleopteran pests, respectively.

## Introduction

Genetic transformation has become an important tool for crop improvement.[1] The application of engineering to food and feed crops is widely acknowledged as a useful tool for addressing global agricultural challenges of population growth and climate change.[2] Such agricultural biotechnology has been widely adopted by growers, with GM crops to date with insect resistance or herbicide tolerance traits requiring lower inputs and allowing flexibility in crop management strategies, whilst maintaining or increasing crop yield and quality.[3,4]

GM insect-resistant crops have been developed using specific genes isolated from the naturally occurring soil bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt).[5] These genes encode specific insecticidal proteins known as Cry proteins.[6] The introduction of genetically engineered crops incorporating these insecticidal proteins has provided growers with an opportunity to reduce insecticide application required for the management of lepidopteran, coleopteran and dipteran insect-pests.[7,8] To date, Bt cry genes have been widely applied in GM maize and cotton development.[9] For example, in Brazil it is now possible to find at least 12 varieties of Bt cotton released for cultivation that express the Cry1Ac protein alone or fused to Cry2Ab2 or Cry1F proteins.[10] Now, these GM cotton varieties mainly target the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. In the case of the major coleopteran cotton boll weevil *Anthonomus grandis*, the mutant toxin Cry8Ka5, which offers increased activity against this pest, has recently been proposed for incorporation into this agribusiness commodity in Brazil.[8,11]

Given the rapid development of GM crops and their increased presence in food and feed, public concern over traceability, food safety and potential ecological contamination is becoming widespread.[12] As such, there is an increasing demand for analytical methods for the detection of introduced genes encoding DNA or their expressed protein(s) in transgenic plants.[1,9] Moreover, precise and accurate detection methods are a prerequisite for reliable control of GM crops in the agricultural market.[13] Various methodologies have been employed to

[a]Department of Biochemistry, Program of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Av. Salgado Filho, S/N, 59078-970 Natal, RN, Brazil
[b]Pioneer Union for Social Insertion, BR020 Km 12, 70390-125, Planaltina, DF, Brazil
[c]Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, R. 235 S/N, 74605-050, Goiânia, GO, Brazil
[d]EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, PqEB – Av. W5 Norte, P.O. Box 02372, 70770-917, Brasília, DF, Brazil. E-mail: fatima.grossi@embrapa.br; Tel: +55 61 3448 4902
[e]Department of Cellular Biology, University of Brasília, 70910-917, Brasília, DF, Brazil
[f]Catholic University of Brasília, SGAN 916, Av. W5, 70790-160, Brasília, DF, Brazil

detect the presence of GM materials in food.[15–20] Recently, a database of GMO detection methods (GMDD) was developed, which summarizes all GMO detection methods developed to date.[20] Commonly employed DNA-based methods include PCR, real-time PCR and DNA chip technology,[18,19] while protein-based methods include immuno-PCR,[14] mass spectrometry[15,16] and near infrared (NIR) spectroscopy.[17] Although these methods are very accurate and sensitive, they are not cost-effective for large-scale analyses. While less expensive protein-based methods, such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot, also offer accuracy and sensitivity, these methods still have limitations, in that they require trained personnel and are unsuitable for on-site testing.[22]

The immunochromatographic (IC) strip test is a well-established diagnostic tool.[23] This technology offers advantages in terms of speed, simplicity and cost-effectiveness when compared to the abovementioned detection methods.[21] Moreover, IC strip tests also offer convenience for on-site testing under field conditions by untrained personnel.[24] Although several IC strips are now commercially available for the detection of transgenic events, no detection kits are available for GM crops carrying the Cry8ka5 protein. Thus, the goal of this study was to develop an IC strip for the simultaneous detection of the Cry1Ac protein, which is found in Bt crops approved for cultivation, and the Cry8Ka5 mutant protein, which has been employed by our group in the development of transgenic cotton.

## Materials and methods

### Reagents and materials

Goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) conjugated to horseradish peroxidase (HRP), complete and incomplete Freund's adjuvants, chloroauric acid ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), sodium citrate, polyethylene glycol 4000 (PEG 4000), hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) medium, 4-nitrophenyl phosphate and a mouse monoclonal antibody ISO2-1 kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). RPMI1640 medium with L-glutamine and HEPES, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin and rabbit anti-mouse immunoglobulin IgG were purchased from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). A HiTrap protein G HP affinity column was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Gelatin (blotting grade), 4-(4-amino-3,5-dimethylphenyl)-2,6-dimethylaniline (TMB) and a protein assay kit were obtained from Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). A high-flow nitrocellulose membrane, a sample pad, a conjugate pad and an absorbent pad were obtained from Millipore (Bedford, MA, USA). High binding flat-bottomed polystyrene microplates were obtained from Costar (Corning, MA, USA), and cell culture flasks and plates were from TPP (St. Louis, MO, USA). Murine myeloma Sp2/0-Ag14 cell lines were kindly provided by Dr Sandra Farias from UFRGS, Rio Grande do Sul, Brazil.

### Instruments

A XYZ 3050 Biostrip Dispenser and a CM 4000 Cutter were purchased from Bio-Dot (Irvine, CA, USA). A Microplate Reader Spectra Max M2 was obtained from Molecular Devices Corp. (Sunnyvale, CA, USA).

**Preparation of the Bt Cry1Ac and Cry8Ka5 toxins.** The Cry1Ac protein was produced by heterologous expression in *E. coli* JM109, transformed with the recombinant plasmid pKK223-3 containing the truncated Cry1Ac gene of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD73), according to the reported method.[25] The activation of the Cry1Ac toxin was performed with trypsin 1 : 50 (w/w) for 2 h, at 37 °C.

Cry8Ka5 protein production was performed by heterologous expression in *E. coli* BL 21(DE3) containing the mutant gene inserted into plasmid pET101/D TOPO, as described by Oliveira.[8]

All toxin samples were purified, identified by 12% SDS-PAGE, quantified *via* the Bradford method[26] using BSA as a standard, and stored at −80 °C.

### Production of monoclonal antibodies (mAbs)

**Immunization.** The Cry1Ac protein was used as an immunogenic molecule for obtaining mAbs. The Cry1Ac protein (250 μg) was added to 0.25 mL sterilized PBS and emulsified with an equal volume of Freund's complete adjuvant. The solution was applied *via* intraperitoneal injections in ten 8 week-old female Balb/c mice, during a three-week interval. Subsequent immunization (boosters) was applied with incomplete Freund's adjuvant. Later, blood samples were removed from the caudal vein of the mice, at intervals after each booster, and then assayed by indirect ELISA for antibody titration. The mouse with the highest serum titration received a final intraperitoneal injection three days before cell fusion.

Experimental procedures were carried out strictly in accordance with the "Administrative Rules for Laboratory Animals in Brasília (DF) state" (2011), and were approved by The Animal Care and Use Committee of EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology (Brasília, DF, Brazil).

**Cellular fusion and screening of hybridomas.** Cell fusion procedures were performed according to the reported method,[27] with modification. Briefly, spleen cells from the immunized mice were isolated and fused with Sp2/0-Ag14 murine myeloma cell lines at a ratio of 1 : 10 in the presence of 1 mL PEG 4000 solution (0.8 g $mL^{-1}$). The fused cells were diluted with fresh HAT medium and distributed into a 96-well culture plate. After ten days, hybridoma supernatants were analyzed by ELISA for the presence of antibodies against the activated Cry1Ac protein. Culture supernatants from the cells with the highest absorption value were transferred to 24-well culture plates and again tested. Only clones that maintained higher absorption in ELISA tests were chosen for further selection. Cell suspensions from each well of the 24-well culture plate were diluted in order to obtain one cell per well, and distributed into a 96-well culture plate. Wells containing a single hybridoma were retained for antibody production and further characterization. These cloned hybridoma cells were introduced *via* intraperitoneal injection into Balb/c mice pretreated with an injection of 0.3 mL pristane. The resulting ascites were purified using a protein A affinity column.



This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

### ELISA assays

96-well microplates were coated with 1 μg of Cry1Ac or Cry8Ka5 protein in coating buffer (0.05 M carbonate–bicarbonate, pH 9.6) and incubated at 4 °C overnight. The microplates were washed three times with PBST buffer (PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.4). To block remaining sites on the wells, a blocking solution (PBST and 3% (w/v) gelatin) was used for 1 h at 37 °C. After subsequent washing, 100 μL of 1 : 2000 dilution of each mAbs were added and incubated for 1 h at 37 °C. The plate was repeatedly washed three times to remove unbound antibodies and then incubated with 1 : 5000 dilution of goat anti-mouse IgG-HRP prepared in PBST (containing 1% gelatin). The microplates were incubated for 1 h at 37 °C, 100 μL of TMB solution was added to each well, and then the plates were incubated for 10 min at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 50 μL 2 M sulfuric acid and absorbance values at 450 nm were then determined.

**Mapping the binding region of mAbs to Cry1Ac protein.** Synthetic peptides (2.5 μM): PT3b (PPRQGFSHRLSHV), PT4c (LGQGEYRTLSST), PT4d (IIRAPMFSWIHRSAE), PT5d (GTEFAYGTSPNL) and PT5e (FRRELTLTVLDI) were produced by the company GenScript (USA). These peptides were coupled to BSA according to the reported method,[28] and then incubated on a 96-well microplate overnight at 4 °C. The same procedures were followed as described in ELISA assays.

**Sandwich ELISA.** 96-well microplates were coated with 100 μL of capture antibody (mAb) at 1 : 2000 dilution in coating buffer and incubated at 4 °C overnight. Following three repeated washings with PBST, each well was filled with 200 μL of blocking buffer and incubated at 37 °C for 1 h. Afterwards 1 μg Cry1Ac protein was added and incubated at 37 °C for 1 h. Following washing, 100 μL of the detection antibody (mAb) at 1 : 2000 dilution was added to each well and incubated at 37 °C for 1 h. Washes were conducted as in the previous step, 100 μL goat anti-mouse IgG-HRP (1 : 5000 dilution in PBST containing 1% gelatin) was then added to each well and incubated at 37 °C for 1 h. Plates were washed again, and 100 μL TMB solution was finally added to each well. After color development at room temperature for 10 min, the reaction was stopped with 50 μL of 2 M $H_2SO_4$ and the absorbance value was determined at 450 nm.

### Characterization of mAbs

Isotypes of mAbs were obtained using an isotyping kit according to the manufacturer's instructions. Analysis of the cross-reactivity (CR) of antibodies was performed by ELISA, using the Cry8Ka5 recombinant protein as the antigen. The ELISA assay was employed as described previously.

### Preparation of colloidal gold labelling of the anti-Cry mAb

Colloidal gold with a mean particle diameter of 40 nm was produced by the reduction of gold chloride with 1% sodium citrate, as previously described.[29] The probe was prepared as previously reported[30] with minor modifications. Prior to conjugation, the optimal pH and amount of antibody for conjugation were determined. Briefly, 150 μg of purified 1B1 mAb was added drop-wise into 10 mL of a colloidal gold solution (pH 9.0) with gentle stirring. The mixture was agitated for 1 h at room temperature using an overhead shaker. BSA was added to block any remaining free binding sites on the surface of the gold particles, and the solution was again incubated for 30 min at room temperature. Unbound proteins were removed by centrifugation (18 500 × *g* for 30 min, 4 °C), the pellet was washed with deionized water and the mixture was again centrifuged. After removal of the supernatant, the pellet was dissolved in 2 mL of BSA solution at 2% and stored at 4 °C until use.

### Preparation of the immunochromatographic (IC) test strip

The test strip was prepared by applying 5H4 mAb (0.5 μg $\mu L^{-1}$) and anti-mouse IgG (0.5 μg $\mu L^{-1}$) to the nitrocellulose membrane at the test and control lines, respectively. With the test and control lines separated by a distance of 5 mm, the reagents were applied in a dot format using a BioDot XYZ 3050 micro-brush at 1 μL $cm^{-1}$. The total volume dispensed onto the test and control line was 0.5 μL of solution. Therefore, each strip test contained 0.25 μg of 5H4 mAb and anti-mouse IgG at the test and control lines, respectively. The coated membrane was then dried at 37 °C for 30 min. Subsequently, the membrane was blocked with 2% BSA solution to prevent nonspecific adsorption and stored in a desiccator. For the conjugate pad, the airbrush equipment was calibrated to release 10 μL $cm^{-1}$ of 1B1 mAb-gold conjugate. The initial solution of the conjugate used as a detection reagent was at a concentration of 0.075 μg $\mu L^{-1}$. For each strip test, the total volume dispensed was 5 μL, corresponding to 0.375 μg of 1B1 mAb. Afterwards, the conjugate pad was then dried at 37 °C for 30 min. The coated membrane, conjugate pad and absorbent pad were assembled and cut lengthways (5 mm × 70 mm) using a guillotine cutter. The sample pad (absorbent paper) and conjugate pad (glass-fiber membrane) were previously treated with blocking solutions (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 2% (w/v) BSA, 2.5% (w/v) sucrose, 0.3% (w/v) polyvinylpyrrolidone and 0.02% (v/v) sodium azide) and dried at 37 °C overnight.

### IC strip *in vitro* test with Bt Cry1Ac and Cry8ka5 proteins

Purified Cry1Ac and Cry8Ka5 protein samples (2.5 μg $mL^{-1}$) were used to determine the sensitivity of the strips. The samples were prepared in 0.05 M carbonate–bicarbonate, pH 9.6, buffer and 200 μL of each sample, equivalent at a final concentration of 0.5 μg, were dispensed into the wells of a microplate. Afterwards, each individual strip was dipped into test samples and left for 10 min.

### IC strip assay in cotton samples

Cotton leaf samples, GM (Bollgard®), GM (developed by our team) and non-GM (Coker-312), were used to confirm the accuracy of the developed strip test. The GM and non-GM leaf disc samples were ground to a fine powder (100 mg) and

homogenized with 1 mL of extraction buffer (PBS with 0.05% (v/v) Tween-20 and 1% PVP-40 and 0.032 mg $mL^{-1}$ trypsin), according to the reported method.[21] The homogenate was agitated for 30 min and incubated at 37 °C for 1 h. Afterwards, 22 μL of 10 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) was added as the stop solution. These extracts were directly used for strip test evaluation. 200 μL of each sample was dispensed into microplate wells and the strips were dipped into homogenates and incubated at room temperature for 10 min.

### Statistical analyses

Data were analyzed using GraphPad InStat™ (GraphPad software, V2.05). ANOVA analyses were performed using the Bonferroni post test and Tukey's multiple comparison tests with confidence intervals of 95%. Values of $p < 0.01$ and $p < 0.05$ were considered statistically significant.

## Results and discussion

### Recombinant protein production

SDS-PAGE profiles of Cry1Ac and Cry8Ka5 recombinant proteins after expression and purification are shown in Fig. 1. The toxins presented the expected molecular mass (near 70 kDa). The Image Master 2D platinum (v.7.0 GE Healthcare) software was used to estimate the relative percentage of purity of each protein obtained. For both Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins, different batches following expression and purification presented relative purities, which ranged from 75% up to 95%. The SDS-PAGE methodology is widely used by chemical companies for analysis of the purity of commercialized proteins.[22]

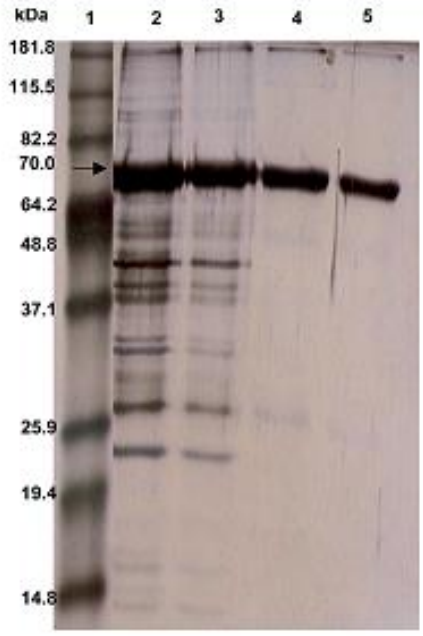



Fig. 1 SDS-PAGE profiles of the heterologous expression products of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins. Lane 1: molecular mass marker (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen); lane 2: before purification of the Cry1Ac protein; lane 3: before purification of the Cry8Ka5 protein; lane 4: Cry1Ac toxin after trypsinization and dialysis; lane 5: Cry8Ka5 toxin after purification on the chromatographic affinity (Ni-NTA resin).

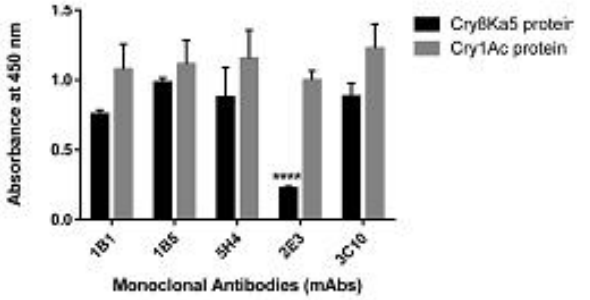



Fig. 2 Evaluation of the cross-interaction of the mAbs anti-Cry1Ac against the Cry8Ka5 recombinant protein by ELISA. High binding EIA/RIA microplates were coated with 1 μg of Cry1Ac or Cry8Ka5 protein and kept overnight at 4 °C. The plates were blocked with 3% gelatin in PBST. An aliquot of 100 μL of each mAbs (1 : 2000) was added for 1 h at 37 °C. The binding was identified using a goat anti-mouse IgG-HRP (1 : 5000) and developed using 100 μL of 4-(4-amino-3,5-dimethylphenyl)-2,6-dimethylaniline (TMB). The reaction was stopped by the addition of 50 μL of 2 M sulfuric acid, and the absorbance was measured at 450 nm. All statistical tests were performed using a two-way ANOVA. ****Denotes $p < 0.01$.

### Production of monoclonal antibodies (mAbs)

Antisera from immunized mice showed higher titer values in ELISA assays using the Cry1Ac protein as the antigen than in non-immunized mice. After fusion, cloning and ascites

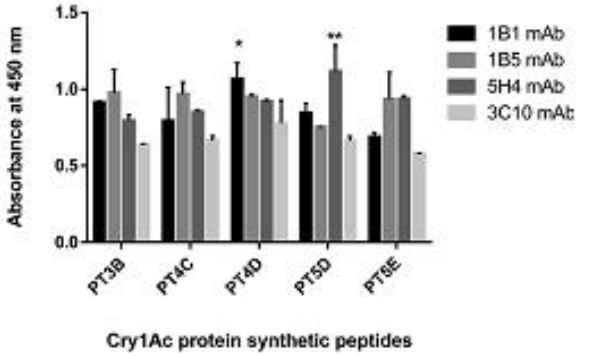



Fig. 3 Epitope mapping of mAbs by ELISA using Cry1Ac toxin synthetic peptides. The peptides coupled with the BSA protein (1 μg) were coated on high binding EIA/RIA microplates and kept overnight at 4 °C. The plates were blocked with 3% gelatin in PBST. An aliquot of 100 μL of each mAb (1 : 2000) was added for 1 h at 37 °C. The binding was identified using a goat anti-mouse IgG-HRP (1 : 5000) and developed using 100 μL of 4-(4-amino-3,5-dimethylphenyl)-2,6-dimethylaniline (TMB). The reaction was stopped by the addition of 50 μL of 2 M sulfuric acid, and the absorbance was measured at 450 nm. All statistical tests were performed using a two-way ANOVA. **Denotes $p < 0.05$.


This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

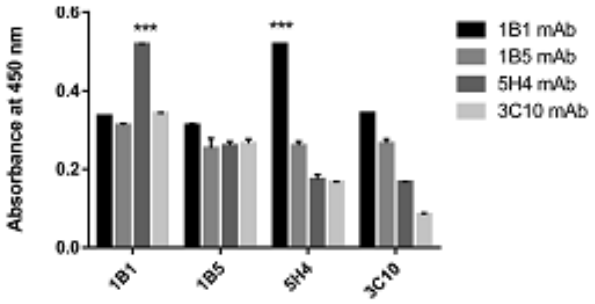



Fig. 4 Evaluation of interaction of mAbs by Sandwich ELISA. High binding EIA/RIA microplates were coated with 100 µL of capture antibody (mAb) at 1 : 2000 dilution in coating buffer at 4 °C overnight. The plates were blocked with 3% gelatin in PBST. Then, 1 µg Cry1Ac protein was added and kept at 37 °C for 1 h. An aliquot of 100 µL of the detection antibody (mAb) at 1 : 2000 dilution was added to each well and incubated at 37 °C for 1 h. Binding was identified using a goat anti-mouse IgG-HRP (1 : 5000) and developed using 100 µL of 4-(4-amino-3,5-dimethylphenyl)-2,6-dimethylaniline (TMB). The reaction was stopped by the addition of 50 µL of 2 M sulfuric acid, and the absorbance was measured at 450 nm. All statistical tests were performed using a two-way ANOVA. ****Denotes $p < 0.01$.

purification, five mAbs were obtained, identified as 1B1, 1B5, 5H4, 2E3 and 3C10. The interaction of each mAb with Cry1Ac or Cry8Ka5 proteins was analyzed by ELISA. The results showed that all mAbs were highly specific to Cry1Ac and were able to recognize Cry8Ka5, with the exception of mAb 2E3 (Fig. 2). Therefore, this mAb was not used in subsequent assessments. These results suggest that the specific mAbs bind to conserved structures among these Cry toxins, as described previously.[34] Previous studies reported a monoclonal antibody produced against a Cry1Ab lepidopteran-specific toxin that also showed cross-reaction with a Cry9 coleopteran-specific toxin.[35] Several mAbs produced against peptide sequences from Cry toxins have been used to elicit the binding site of these proteins with their specific receptors.[32,33,36] It is important to increase knowledge about the mode of action of Cry toxins for target insects. In this study, specific synthetic peptides of the binding region of the cadherin-like receptor from *Helicoverpa armigera* (HaCad) to the Cry1Ac protein (data not shown) were used for epitope mapping of mAbs produced. For this assay, the Cry1Ac protein was not previously activated because the PT5e peptide sequence is localized in the N-terminal domain found on the truncated Cry1Ac protein. As shown in Fig. 3, of the five peptides tested, only the PT4d and PT5d sequences to mAbs 1B1 and 5H4 showed a statically significant difference ($p < 0.05$). These findings suggest that the 1B1 and 5H4 mAbs recognized different binding sites on the Cry1Ac protein. To confirm these results, a sandwich ELISA assay was performed. Pairwise mAb combinations are shown in Fig. 4. When the combination of 5H4 mAb capture antibody and 1B1 mAb as the second antibody was used, an increase in pairing occurred ($p < 0.05$) greater than those observed in other mAb combinations. Hence, these two mAbs were selected and used for the preparation of the strip test.

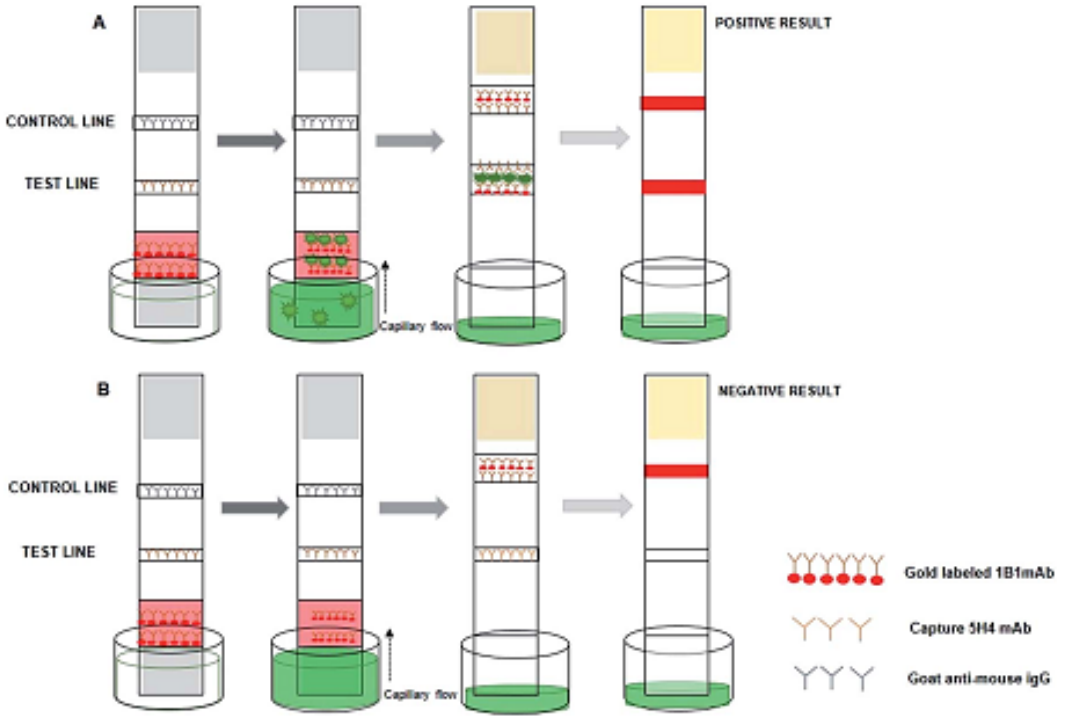



Fig. 5 The schematic image of the assembled strip test and the principle of detection using the sandwich immunoassay format (A) samples with Cry1Ac or Cry8Ka5 protein. (B) Samples without Cry1Ac or Cry8Ka5.

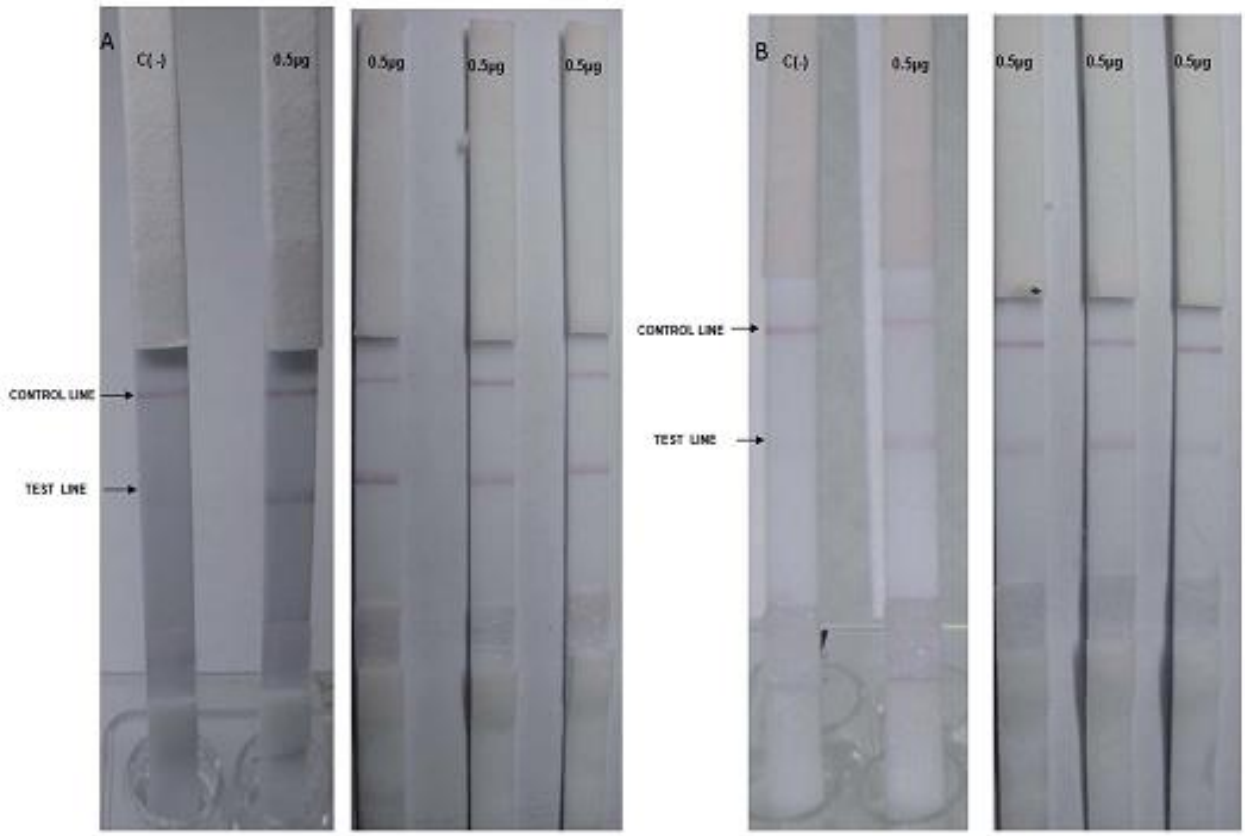



Fig. 6 Immunochromatographic strip test for Cry1Ac and Cry8Ka5 protein detection. Tests were evaluated using 0.5 μg of Cry1Ac toxin (A) and 0.5 μg of Cry8Ka5 toxin (B). (–) Corresponds to the negative control of 0.05 M carbonate–bicarbonate without the Bt proteins, pH 9.6 buffer (200 μL).

### Development and optimization of the strip test

In this study, we developed a test strip based on a sandwich immunoassay format for qualitative detection of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins found in transgenic plants (Fig. 5). The system in the sandwich format employs two different antibodies that bind to distinct epitopes of the analyte. A labeled antibody is placed onto a glass-fiber membrane (conjugate pad) to serve as the detector reagent and another antibody is sprayed at the test line of the nitrocellulose membrane to serve as the capture reagent. A second antibody specific to recognize the first antibody is used to produce a control signal.[21]

As shown in Fig. 6, the strip tests were placed into the wells of microplates carrying test samples and the test results interpreted as positive or negative based upon visual inspection. As the sample flowed sequentially through the detection antibody (1B1 mAb) and the capture antibody (5H4 mAb), the Cry1Ac protein (Fig. 6A) or Cry8Ka5 (Fig. 6B) accumulated on the test line, to reveal a visible red line. A second red line was also observed on the control line, indicating correct test performance. A solution containing only extraction buffer without trypsin was used as the negative control. With this solution, no color developed on the test line, indicating the absence of Cry1Ac or Cry8Ka5 proteins. These results indicated that the developed strip test enabled specific detection of Cry1Ac or Cry8Ka5 in GM samples, showing high sensitivity levels.

### Validation of strip test using GM cotton samples

Bollgard® cotton (positive control) and Coker 312 (negative control) samples were previously identified by using a commercial strip test produced by Envirologix Inc. (data not shown). Cry1Ac and Cry8Ka5 toxin concentration levels from GM cotton leaf samples were estimated using a previously established standard curve (Fig. 7A). The standard concentrations of Cry1Ac and Cry8Ka5 toxins (0 to 1 μg) resulted in a standard curve with a good linearity of $R^2 = 0.9714$ and 0.9862, respectively. The cotton plants developed by our team were analyzed by PCR assays (data not shown) and two positive plants (named plant 50 and 217) were further characterized by ELISA. As shown in Fig. 7B, only plant 50 showed a statically significant difference ($p < 0.05$) to the non-GM cotton plant. Therefore, this plant was chosen for use in determining the accuracy of the strip test.

According to previous study reports,[17] the level of expression of the Cry1Ac protein in terminal leaf tissues was estimated to be 2.98 ng $mg^{-1}$ or 2.98 μg $g^{-1}$ dry tissue. In this study, we used 100 mg (dry tissue) of total protein extract from GM and non-GM cotton leaves. After the extraction procedure, the


This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

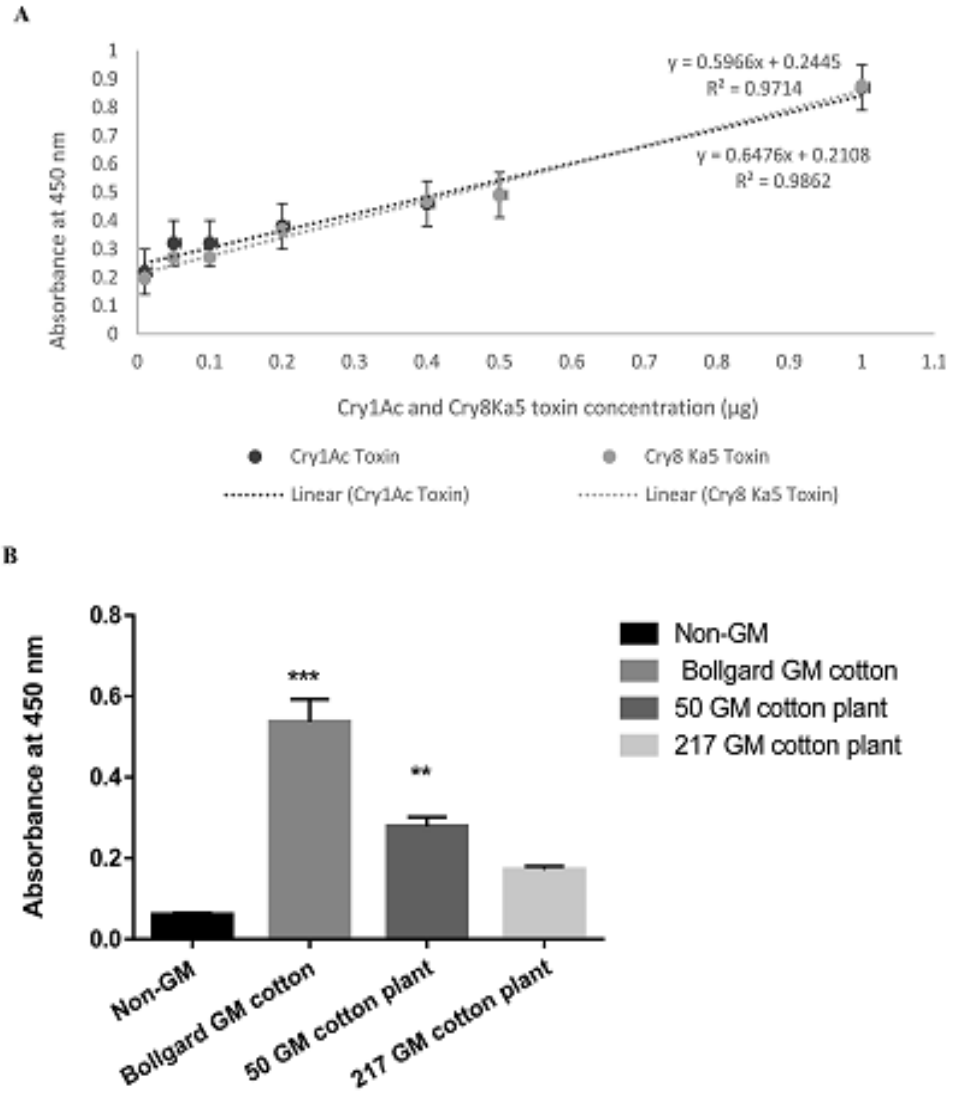



Fig. 7 Evaluation of accuracy of the strip test using GM cotton leaf samples. (A) Standard curve of Cry1Ac and Cry8Ka5 (0–1 µg) toxins using 1B1mAb. (B) Detection of Cry1Ac protein (Bollgard® GM cotton) used as a positive control and Cry8Ka5 protein (GM 50 and GM 217 cotton plant developed by our team). Non-GM (Coker 312) was used as a negative control. ***All statistical tests were performed using a two-way ANOVA. ***Denotes $p < 0.05$.

estimated amount of the Cry1Ac and Cry8Ka5 transgenic proteins in the sample was 0.298 µg mL$^{-1}$. For evaluation of the strip test, an aliquot of 200 µL of extract was used, giving an approximate concentration of 0.06 µg for Cry1Ac and Cry8Ka5.

As shown in Fig. 8, two red lines are clearly visualized in the test and control lines when all GM samples were applied to the strip test. This means that the strip test developed in this study reacts with Cry8Ka5 and Cry1Ac proteins found in these GM cotton samples (Fig. 8A and B, respectively). As expected, only a strong red line on the control line was observed when the non-GM samples (Coker 312) were applied to the strip test.

Currently, strip tests are commercially available to detect Bt transgenic proteins in GM cotton events used commercially to control lepidopterans.[22] These events include Bollgard® (expressing the Cry1Ac protein), Bollgard II® (expressing the Cry1Ac and Cry2Ab proteins) and Widestrike® (expressing Cry1Ac and Cry1F proteins). Now, however, no strip tests are available for the detection of the Bt Cry8Ka5 protein, which is used for the development of Brazilian GM cotton effective against the cotton boll weevil coleopteran insect pest, which is particularly harmful in Latin America.[8]

## Conclusion

In the present study, we developed a qualitative immunochromatographic strip test for the detection of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins found in insect-resistant GM crops. The results showed that the strip test was sufficiently sensitive and accurate for the detection of these proteins in GM cotton crops. Moreover, these results were obtained within 10 min without the need for expensive equipment or reagents. The strip test is applicable for use directly in the field, as a rapid and cost-effective screening tool for Cry1Ac or Cry8Ka5 protein detection in GM crops.

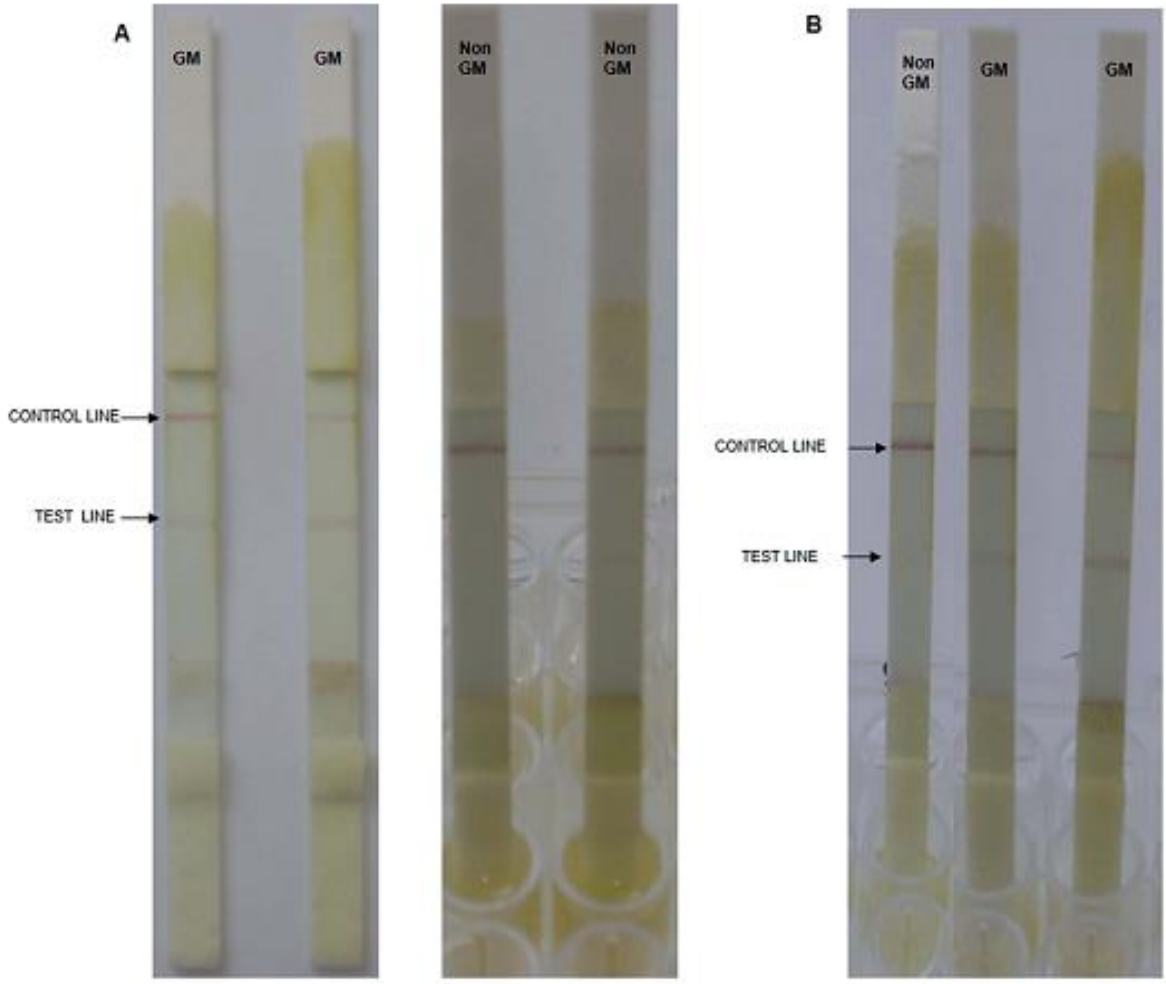



Fig. 8 Evaluation of the strip test for the detection of Cry8Ka5 and Cry1Ac toxins in GM and non-GM cotton leaf samples. (A) GM cotton leaf samples (developed by our team) containing the Cry8Ka5 toxin (B) Bollgard® cotton leaf samples containing the Cry1Ac protein. Non-GM cotton leaf samples (Coker 312).

## Conflict of interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors thank CNPq (Grant number: 350165/2008-4), CAPES (Grant number: 1113634) and EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology (Grant number: 02.09.01.013.00.03) for financial support for this study.

## References

1 E. Anklam, F. Gadani, P. Heinze, H. Pijnenburg and G. van Den Eede, *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **214**, 3–26.
2 P. D. Brune, A. H. Culler, W. P. Ridley and K. Walker, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 8243–8247.
3 C. James, Global Status of commercialized Biotech/GM crops: 2013. ISSA Brief 43, ISAAA., N.Y, 2013.
4 G. Brookes and P. Barfoot, GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, *GM Crops & Food*, 2013, **4**(1), 74–83.
5 J. Li, J. Carroll and D. J. Ellar, *Nature*, 1991, **353**, 815–821.
6 S. Atsumi, Y. Inoue, T. Ishizaka, E. Mizuno, Y. Yoshizawa, M. Kitami and R. Sato, *FEBS J.*, 2008, **275**, 4913–4926.
7 R. V. Gunning and G. D. Moores, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2010, **97**, 55–59.
8 G. R. Oliveira, M. C. M. Silva, W. A. Lucena, E. Y. T. Nakasu, A. A. P. Firmino, M. A. Beneventi, D. S. L. Souza, J. E. Gomes-Jr, J. D. A. de Souza-Jr, D. J. Rigden, H. B. Ramos, C. R. Soccol and M. F. Grossi-de-Sá, *BMC Biotechnol.*, 2011, **11**, 85–97.
9 J. W. Stave, *J. AOAC Int.*, 2002, **85**, 780–786.
10 CNTBIO, http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14783.html, (accessed September 2014).


This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

11 D. F. Farias, M. P. Viana, G. R. Oliveira, V. O. Santos, C. E. M. Pinto, D. A. Viana, I. M. Vasconcelos, M. F. Grossi-de-Sá and A. F. U. Carvalho, *Food Chem. Toxicol.*, 2015, **81**, 81–91.
12 X. Wang, D. Teng, Q. Guan, F. Tian and J. Wang, *Food Chem.*, 2015, **173**, 1022–1029.
13 D. Morisset, T. Demsar, K. Gruden, J. Vojvoda, D. Stebih and J. Zel, *Nat. Biotechnol.*, 2009, **27**, 700–701.
14 R. C. Allen, S. Rogelj, S. E. Cordova and T. L. Kieft, *Immunol. Methods*, 2006, **308**, 109–115.
15 W. C. Byrdwell and W. E. Neft, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 1996, **19**, 2203–2225.
16 M. F. Ocana, P. D. Fraser, R. K. Patel, J. M. Halket and P. M. Bramley, *Mass Spectrom.*, 2007, **21**, 319–328.
17 L. J. Xie, Y. B. Ying and H. Y. Yu, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **584**, 379–384.
18 K. S. Kumar and S. H. Kang, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 4247–4254.
19 S. Leimanis, M. Hernandez, F. Boyer, M. Burns, S. Bruderer, T. Glouden, N. Harris, O. Kaeppeli, P. Philipp, M. Pla, P. Puigdomenech, M. Vaitilingom, Y. Bertheau and J. Remacle, *Plant Mol. Biol.*, 2006, **61**, 123–139.
20 W. Dong, L. Yang, K. Shen, B. Kim, G. A. Kleter, H. J. Marvin, R. Guo, W. Liang and D. Zhang, *BMC Bioinf.*, 2008, **9**, 260–267.
21 B. Ngom, Y. Guo, X. Wang and D. Bi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 1113–1135.
22 R. Kumar and R. P. Sinha, *Int. J. Pharma Bio Sci.*, 2011, **2**, 111–121.
23 G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf and A. van Amerongen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **393**, 569–582.
24 R. Kumar, C. K. Singh, S. Kamle, R. P. Sinha and D. N. Kachru, *Food Chem.*, 2010, **122**, 1298–1303.
25 D. F. Farias, M. P. Viana, G. R. Oliveira, M. A. Beneventi, B. M. Soares, C. Pessoa, I. P. Pessoa, L. P. Silva, I. M. Vasconcelos, M. F. Grossi-de-Sá and A. F. U. Carvalho, *BioMed Res. Int.*, 2014, DOI: 10.1155/2014/810490.
26 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.
27 G. Köhler and C. Milstein, *Nature*, 1973, **256**, 495–497.
28 S. S. Lateef, S. Gupta, L. P. Jayathilaka, S. Krishnanchettiar, J.-S. Huang and B.-S. Lee, *J. Biomol. Tech.*, 2007, **18**, 173–176.
29 M. A. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications*, Academic Press, New York, 1989.
30 L. Biing-Hui, H. Yu-Tien, L. Chuan-Chen and Y. Feng-Yih, *Food Control*, 2013, **30**, 184–189.
31 G. Shan, S. K. Embrey and B. W. Schafer, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 5974–5979.
32 S. Atsumi, E. Mizuno, H. Hara, K. Nakanishi, M. Kitami, N. Miura, H. Tabunoki, A. Watanabe and R. Sato, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 3966–3977.
33 H. Hara, S. Atsumi, K. Yaoi, K. Nakanishi, S. Higurashi, N. Miura, H. Tabunoki and R. Sato, *FEBS Lett.*, 2003, **538**, 29–34.
34 E. Schnepf, N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, **62**, 775–806.
35 U. Walshus, S. Witt and C. Wittman, *Food Agric. Immunol.*, 2002, **14**, 231–240.
36 R. Xie, M. Zhuang, L. S. Ross, I. Gomez, D. I. Oltean, A. Bravo, M. Soberon and S. S. Gill, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 8416–8425.
37 M. W. Siebert, T. G. Patterson, G. J. Gilles, S. P. Nolting, L. B. Braxton, B. R. Leonard, J. W. van Duyn and R. B. Lassiter, *J. Econ. Entomol.*, 2009, **102**, 1301–1308.

# APENDICE B – ARTIGO À SER SUBMETIDO PARA A REVISTA TOXINS

ISSN 2072-6651- Impact factor 2.938

**A sensitive Lateral flow assay for identification of fungal toxins in food products.**

Vanessa O. Santos[1,4], Patrícia B. Pelegrini[4], Fernanda Mulinari[2,4], Ariane F. Lacerda[1,4,6], Rodrigo S. Moura[3], Ludimila P.V. Cardoso[3], Samira Bührer-Sékula[3], Robert N. G. Miller[5], Maria Fatima Grossi-de-Sa[4,6*]

[1] Department of Biochemistry, Program of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Av. Salgado Filho, S/N, 59078-970 Natal, RN, Brazil.

[2] Pioneer Union for Social Insertion, BR020 Km 12, 70390-125, Planaltina, DF, Brazil.

[3] Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, R. 235 S/N, 74605-050, Goiânia, GO, Brazil.

[4] EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology PqEB - Av. W5 Norte, P.O. Box 02372, 70770-917, Brasília, DF, Brazil.

[5] Department of Cellular Biology, University of Brasília, 70910-917, Brasília, DF, Brazil.

[6] Catholic University of Brasilia, SGAN 916, Av. W5, 70790-160, Brasília, DF, Brazil.

**Abstract**

Currently, there is demand for the development of rapid methods for evaluating food quality and safety to avoid contamination by toxic substances. Aflatoxins are a class of highly toxic contaminants found in agricultural products. Consumption of aflatoxin-contaminated food can have harmful effects on human health. The immunochromatographic test strip technique is a promising method for the detection of these contaminants in food samples. In this study, we developed an immunocromatographic strip test for rapid detection of aflatoxins in agricultural products. We generated a monoclonal antibody against aflatoxin $B_1$, named 3B6, which binds

with high specificity to aflatoxin $B_1$ and $M_1$. Moreover, the 3B6 antibody shown cross reactivity to aflatoxin G1, G2 and B2. Nanoparticles gold colloidal were coated with 3B6 antibody and used as detector reagent. The strip test was developed in a competitive assay format, in this positive results were indicated by the formation of one colored line in a competitive assay format. Artificially contaminated soybean grains samples were used to evaluate the test strips. The results indicated that strip has a visual detection limit of 0.5 ng/mL . Moreover, the test strip was capable of detecting aflatoxins in food products. Therefore, we considered this test strip is a useful screening tool because of its portable, low cost, efficience for the qualitative detection of aflatoxins in various food samples.

**Keywords*:*** Aflatoxins; Lateral flow Assay, Rapid test; Food Contaminants; Food safety; *Aspergillus flavus*

# ANEXO A- ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE DO DOUTORADO

Gene 553 (2014) 7–16

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

## Molecular cloning and characterization of an α-amylase cDNA highly expressed in major feeding stages of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*

C.A. Bezerra [a,b], L.L.P. Macedo [a,b], T.M.L. Amorim [c], V.O. Santos [c], R.R. Fragoso [d], W.A. Lucena [e], A.M. Meneguim [f], A. Valencia-Jimenez [g], G. Engler [h], M.C.M. Silva [b], E.V.S. Albuquerque [b], M.F. Grossi-de-Sa [a,b,*]

[a] Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil
[b] Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil
[c] Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil
[d] Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil
[e] Embrapa Cotton, Campina Grande, PB, Brazil
[f] Agronomic Institute of Paraná, Londrina, PR, Brazil
[g] University of Caldas, Manizales, Colombia
[h] Institut National de la Recherche Agronomique, Sophia-Antipolis, France

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 25 July 2014
Received in revised form 18 September 2014
Accepted 22 September 2014
Available online 28 September 2014

*Keywords:*
Curculionidae
Gene expression
Insect pest
Starch hydrolysis
Enzyme modeling

ABSTRACT

α-Amylases are common enzymes responsible for hydrolyzing starch. Insect-pests, whose larvae develop in seeds, rely obligatorily on α-amylase activity to digest starch, as their major food source. Considering the relevance of insect α-amylases and the natural α-amylase inhibitors present in seeds to protect from insect damage, we report here the molecular cloning and nucleotide sequence of the full-length *AmyHha* cDNA of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, a major insect-pest of coffee crops. The *AmyHha* sequence has 1879 bp, containing a 1458 bp open reading frame, which encodes a predicted protein with 485 amino acid residues, with a predicted molecular mass of 51.2 kDa. The deduced protein showed 55–79% identity to other insect α-amylases, including *Anthonomus grandis*, *Ips typographus* and *Sitophilus oryzae* α-amylases. In depth analysis revealed that the highly conserved three amino acid residues (Asp184, Glu220, and Asp285), which compose the catalytic site are also presented in AmyHha amylase. The *AmyHha* gene seems to be a single c in the haploid genome and *AmyHha* transcription levels were found higher in L2 larvae and adult insects, corresponding to major feeding phases. Modeling of the AmyHha predicted protein uncovered striking struc similarities to the *Tenebrio molitor* α-amylase also displaying the same amino acid residues involved in enzyme catalysis (Asp184, Glu220 and Asp285). Since *AmyHha* gene was mostly transcribed in the intestinal tract of

## ANEXO A- ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE DO DOUTORADO

Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

# Food safety assessment of Cry8Ka5 mutant protein using Cry1Ac as a control *Bt* protein

Davi Felipe Farias [a], Martônio Ponte Viana [a], Gustavo Ramos Oliveira [b,c], Vanessa Olinto Santos [c], Clidia Eduarda Moreira Pinto [a], Daniel Araújo Viana [d], Ilka Maria Vasconcelos [a], Maria Fátima Grossi-de-Sa [c,e], Ana Fontenele Urano Carvalho [a,*]

[a] Graduate Program in Biochemistry, Federal University of Ceará, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil
[b] Graduate Program in Bioprocess Engineering and Biotechnology, Federal University of Paraná, P.O. Box 19011, 81531-98, Curitiba, PR, Brazil
[c] Parque Estação Biológica, National Center of Genetic Resources (Embrapa-Cenargen), PqEB - Av. W5 Norte (final), P.O. Box 02372, 70770-917, Brasília, DF, Brazil
[d] Graduate Program in Biotechnology, Ceará State University, 60740-903, Fortaleza, CE, Brazil
[e] Graduate Program in Gemonics Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, SGAN Quadra 916, Módulo B, W5 Norte, Asa Norte, 70790-160 Brasília, DF, Brazil

## ANEXO B- ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Ref.: Ms. No. BTEC-D-15-00094

The recombinant pea defensin Drr230a is active against impacting soybean and cotton pathogenic fungi from the genera Fusarium, Colletotrichum and Phakopsora

3Biotech