

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
TRIÂNGULO MINEIRO – *CAMPUS* UBERABA
Programa de Pós-Graduação
Mestrado Profissional em Produção Vegetal**

RÔMULO PEREIRA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE CRY1AC EM
SEMENTES DE SOJA**

**Uberaba
2024**

RÔMULO PEREIRA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE CRY1AC EM
SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Produção Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro – Campus Uberaba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Linha de Pesquisa: Sistemas Produtivos no Cerrado.

Orientador: Prof. Dr. Édimo Fernando Alves Moreira.

**Uberaba
2024**

Ficha Catalográfica elaborada pelo Setor de Referência do IFTM –
Campus Uberaba-MG

B38o Silva, Rômulo Pereira da
Otimização de protocolo de ELISA para detecção de Cry1AC em
sementes de soja / Rômulo Pereira da Silva – 2024.
47 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Édimo Fernando Alves Moreira.
Dissertação (Mestrado Profissional em Produção Vegetal) - Instituto
Federal do Triângulo Mineiro- *Campus Uberaba-MG*, 2024.

1. Pragas. 2. Transgênicos. 3. *Bacillus thuringiensis*. 4. Híbridos.
I. Moreira, Édimo Fernando Alves. II. Título.

CDD 633.34

RÔMULO PEREIRA DA SILVA

“OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE CRY1AC EM SEMENTES DE SOJA”

FOLHA DE APROVAÇÃO DEFESA DISSERTAÇÃO

Data da aprovação: 12/11/2024

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente

Prof. Dr. Hamilton César de Oliveira Charlo

IFTM - CAMPUS UBERABA

Membro Titular

Prof. Dr. Daniel Rufino Amaral

IFTM - CAMPUS UBERABA

Membro Titular

Dr. Humberto Pereira da Silva

BAYER

Local: Sala de videochamada: meet.google.com/wou-wite-kfa

HAMILTON CÉSAR DE OLIVEIRA CHARLO
PROFESSOR DO ENSINO BÁSICO, TÉCNICO E TECNOLÓGICO



Documento assinado eletronicamente por HAMILTON CÉSAR DE OLIVEIRA CHARLO, PROFESSOR DO ENSINO BÁSICO, TÉCNICO E TECNOLÓGICO, em 12/11/2024, às 15:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

DANIEL RUFINO AMARAL
PROFESSOR DO ENSINO BÁSICO, TÉCNICO E TECNOLÓGICO



Documento assinado eletronicamente por DANIEL RUFINO AMARAL, PROFESSOR DO ENSINO BÁSICO, TÉCNICO E TECNOLÓGICO, em 12/11/2024, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

HUMBERTO PEREIRA DA SILVA
MEMBRO EXTERNO DE BANCA DE QUALIFICAÇÃO E DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO



Documento assinado eletronicamente por HUMBERTO PEREIRA DA SILVA, MEMBRO EXTERNO DE BANCA DE QUALIFICAÇÃO E DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO, em 13/11/2024, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://iftm.edu.br/autenticacao/> informando o código verificador **B325DE3** e o código CRC **91934FFF**.

À minha avó (*in memoriam*),
pela inspiração, dedicação e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por toda torcida.

À minha avó Otília (*in memoriam*), por todo amor incondicional e fé.

Ao meu orientador Prof. Dr. Édimo Fernando, por apoiar e acreditar nesse projeto.

À minha coorientadora Carolini Stabach, pela dedicação e paciência.

Ao meu amigo Humberto Pereira, pelo incentivo.

Aos meus colegas Fernanda, Mariana e Willow, por toda compreensão.

RESUMO

A soja (*Glycine max* L.) é uma cultura amplamente utilizada na agricultura em todo o mundo e a incidência de pragas é um dos fatores limitantes para seu cultivo, sendo empregados nos cultivos de híbridos transgênicos resistente à insetos. A Cry1AC de *Bacillus thuringiensis* (Bt), é uma proteína expressa em plantas transgênicas de soja com ação inseticida. A detecção da expressão de genes transgênicos pode ser realizada utilizando várias técnicas laboratoriais avançadas incluindo o teste de ELISA. O Elisa tem a capacidade de detectar a presença do antígeno através de anticorpos de captura e de detecção. Neste trabalho, um protocolo de ELISA foi otimizado para detectar a proteína Cry1Ac em sementes de soja. As sementes foram esmagadas e adicionada solução de extração para o DNA. Para montagem das placas de Elisa, foram testadas as concentrações de 1,88 ug/mL e 7,5 ug/mL de anticorpos de captura e as diluições de 1/3200 e 1/800 de anticorpos de detecção, avaliados em cada etapa do teste. Os resultados obtidos mostraram que podemos otimizar o teste com especificidade e sensibilidade, utilizando-se a concentração de 1,88 ug/mL de anticorpo de captura; ou, reduzindo o tempo de teste considerando a eliminação da etapa de bloqueio e a incubação do anticorpo de detecção junto a amostra a 7,5 ug/mL de anticorpo de captura.

Palavras-chave: pragas; transgênicos; *bacillus thuringiensis*; híbridos.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* L.) is a crop widely used in agriculture worldwide, and pest incidence is one of the limiting factors for its cultivation. As a result, insect-resistant transgenic hybrids are employed in soybean farming. The *Cry1AC* protein from *Bacillus thuringiensis* (Bt) is an insecticidal protein expressed in transgenic soybean plants. The detection of transgenic gene expression can be carried out using several advanced laboratory techniques, including the ELISA test. ELISA can detect the presence of an antigen through capture and detection antibodies. In this study, an ELISA protocol was optimized to detect the *Cry1AC* protein in soybean seeds. The seeds were crushed, and an extraction solution was added to the DNA. For the assembly of the ELISA plates, concentrations of 1.88 µg/mL and 7.5 µg/mL of capture antibodies were tested, along with dilutions of 1/3200 and 1/800 of detection antibodies, evaluated at each stage of the test. The results showed that we could optimize the test with specificity and sensitivity, using a concentration of 1.88 µg/mL of capture antibody; or, reducing the test time by eliminating the blocking step and incubating the detection antibody with the sample at 7.5 µg/mL of capture antibody.

Keywords: pests; transgenics; *bacillus thuringiensis*; hybrids.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 — Bloco de extração de DNA de sementes de Soja.....	23
Figura 2A — Mapa da disposição dos anticorpos de captura.....	24
Figura 2B — Mapa da disposição dos anticorpos de detecção.....	26
Figura 3 — Mapa da disposição das diferentes tecnologias nas sementes de soja.....	29
Figura 4 — Representação gráfica das concentrações.....	31
Figura 5 — Representação gráfica da comparação das concentrações.....	32
Figura 6 — Representação gráfica do uso da etapa de bloqueio.....	33
Figura 7— Representação gráfica do uso da etapa de bloqueio na especificidade.....	34
Figura 8 — Representação gráfica da comparação entre a adição juntamente e separada da amostra ao anticorpo de detecção.....	35
Figura 9 — Representação gráfica da especificidade quanto a adição juntamente e separada da amostra ao anticorpo de detecção.....	36
Figure 10 — Representação gráfica da especificidade quanto a adição juntamente da amostra com anticorpo de detecção.....	37
Figura 11— Representação gráfica da especificidade de sementes de soja para Cry1Ac.....	38
Quadro 1— Esquema resumido dos experimentos I, II, III, IV e V.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Fosfatase alcalina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CIB	Conselho de Informações sobre Biotecnologia
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COVID-19	Coronavírus disease 2019
Cry	Grupo de proteínas originadas da <i>bacillus thurigiensis</i>
Cry1Ac	Proteína que confere resistência à insetos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	Horseraddish Peroxidase
IPRO	Tecnologia que confere resistência à insetos na cultura da soja
ISAAA	International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
KCl	Cloreto de Potássio
LTDA	Limitada
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços
Mir162	Evento da construção de gene com resistência à insetos
MON 87701	Evento da construção de gene com resistência à insetos
MON89788	Evento da construção de gene com resistência à insetos
MPCR	Multiplex Polymerase Chain Reaction
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
OD	Optical Density
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
PBS	Phosphatase buffered saline (tampão salina fosfato)
PBS-T	Phosphate Buffered Saline with Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potencial hidrogeniônico
qPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid

RPM	Rotação por minuto
RR	Roundup Ready
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TMB	Tetrametilbenzidina
TMG	Fabricante de equipamentos de laoratório
Tween-20	Polysorbate 20
VIP3Aa	Tecnologia que confere resistência à viptera
XTD	Tecnologia que confere resistência à insetos na cultura da soja
2XTD	2 Xtend

LISTA DE SIMBOLOS

*	Asterisco
°C	Graus Celsius
=	Igual
+	Mais
>	Maior
®	Marca registrada
≤	Menor igual
<	Menor
µg	Micrograma (10 ⁻⁶ grama)
uL	Microlitro (10 ⁻⁶ Litro)
mL	Mililitro (10 ⁻³ Litro)
mm	Milímetro (10 ⁻³ metros)
mg	Miligramma
%	Porcentagem
1X	Uma vez

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Soja: características e impacto econômico e social	15
2.2	A cultura da soja.....	16
2.3	Soja Transgênica.....	17
2.4	Proteína Cry1AC e Soja Transgênica	18
2.5	Métodos de Detecção de Expressão de Genes Transgênicos	18
2.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Ressuspensão dos anticorpos.....	22
3.2	Obtenção do lisado proteico	22
3.2.1	<i>Extração proteica</i>	22
3.3	Experimento I: Determinação da concentração dos anticorpos	23
3.3.1	<i>Titulação</i>	23
3.3.2	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Elisa</i>	24
3.3.2.1	<i>Sensibilização com anticorpo de captura</i>	24
3.3.2.2	<i>Bloqueio</i>	25
3.3.2.3	<i>Adição da amostra (lisado proteico)</i>	25
3.3.2.4	<i>Adição do anticorpo de detecção</i>	25
3.3.2.5	<i>Adição de substrato e leitura</i>	26
3.3.3	<i>Análise de concentrações</i>	26
3.3.4	<i>Ponto de corte</i>	26
3.4	Experimento II: Avaliação da etapa de bloqueio	27
3.5	Experimento III: Incubação da amostra junto ao anticorpo de detecção	27
3.6	Experimento IV: Determinação da concentração dos anticorpos na condição: incubação da amostra junto ao anticorpo de detecção. ...	28
3.7	Experimento V: Especificidade	28
3.8	Análise estatística	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é uma das principais culturas agrícolas do mundo. Os grãos da soja são usados na alimentação humana, na alimentação animal e na produção de óleos. Na safra 2023/2024 foram plantados 132,6 milhões de hectares de soja, com uma produção de 394,754 milhões de toneladas em todo o mundo e um valor de mercado estimado em US\$ 155 bi. O Brasil é o maior produtor mundial, com cerca de 39% da produção global, seguido pelos Estados Unidos, responsável por aproximadamente 29% da produção (Usda, 2024). A soja transgênica representa uma parte considerável da produção global, especialmente em nações como o Brasil e os Estados Unidos, que são líderes na adoção de tecnologias de sementes geneticamente modificadas. Um dos grandes limitantes à produtividade de soja é a incidência de insetos pragas (Devine; Furlong, 2007). As pragas são responsáveis por perdas médias de 35% da produtividade, e seu controle representa um custo significativo do processo de produção.

Uma das estratégias utilizadas com sucesso no manejo integrado de pragas da soja é o uso da soja transgênica MON87701 × MON89788 (Intacta RR2 PRO®). As plantas de soja transgênica expressam a proteína inseticida Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (evento MON 87701) (Miklos *et al.*, 2007). *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete que produz uma variedade de proteínas pesticidas, que incluem as proteínas Cry1Ac (Höfte; Whiteley, 1989). Essas proteínas agem no intestino das larvas de insetos, provocando a sua lise e consequente morte. Uma vantagem no uso proeminente da soja Bt é a redução do uso de pesticidas químicos, que gera benefícios econômicos para os agricultores, além de baixos riscos ambientais (Brookes; Barfoot, 2020).

No cultivo e na produção das sementes transgênicas, é importante monitorar a expressão dos genes. Isso é essencial para garantir um controle de qualidade rigoroso no processo de produção de sementes, entregar o desempenho prometido aos produtores, sustentando o efeito inseticida promovido pela expressão da proteína (Clapper; Kurman, 2011). As técnicas analíticas para identificação de expressão de proteínas transgênicas na soja incluem métodos baseados na análise do DNA, assim como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), o MPCR (*Multiplex Polymerase Chain Reaction*) e o ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). O Elisa é o mais amplamente recomendado e utilizado, pois além de detectar a expressão de Cry1Ac

em plantas transgênicas de soja, como o PCR e o MPCR, ele permite também quantificar essas proteínas (Conceição; Moreira; Binsfeld, 2006).

No protocolo, uma solução tampão de revestimento contendo um anticorpo de captura é adicionada à poços de uma placa para aderir. Essa placa é encubada em estufa e em seguida adicionada uma solução de bloqueio. A amostra é então adicionada aos poços da placa e novamente é incubada por um período. Decorrido o período, o anticorpo de detecção conjugado com uma enzima é adicionado aos poços da placa. Entre cada etapa, os poços da placa são lavados com solução salina tamponada com um fosfato. Uma solução de substrato é adicionada e um leitor de placas é utilizado para detectar o resultado (Shah; Maghsoudlou, 2016). O resultado é considerado positivo para a substância analisada, quando ocorrer mudança de cor do substrato (Kumar; Aizawl, 2016). A definição do ponto de corte do teste de Elisa é importante para avaliar a sensibilidade e a especificidade do teste (Carminati *et al.*, 2003).

Dada a complexidade da técnica, o protocolo ELISA apresenta altos custos para realização e poucas possibilidades de otimização para identificação de proteínas Cry. Isso dificulta o controle de qualidade genético na produção de sementes das plantas transgênicas. Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa é validar e otimizar uma metodologia de ELISA específica, sensível, rápida para a detecção de proteínas Cry1Ac na soja, a fim de contribuir com o sucesso no manejo integrado de pragas da cultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soja: características e impacto econômico e social

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma leguminosa (Fabaceae) de origem asiática, mais especificamente chinesa, vastamente utilizada há milênios na alimentação humana e animal em diversas regiões do mundo. O cultivo dessa oleaginosa é considerada uma das mais importantes no mundo. Atualmente, o Brasil, é o maior produtor e exportador global de soja em grão, além do segundo detentor de estoques finais e terceiro esmagador. O Brasil é líder global, sendo a soja o produto de maior destaque no que se refere às exportações brasileiras (Gazzoni; Dall'Agnol, 2018a; Landau *et al.*, 2020; Embrapa Soja, 2015; Brasil, 2015; Fao, 2018; Coêlho, 2024).

Essa cultura possui uma grande importância em diversos âmbitos, desde o econômico até o social, existindo uma projeção futura bastante promissora visto que o consumo mundial da soja seguirá aumentando nos próximos anos, mantendo os bons preços de mercado e impulsionando as exportações. No Brasil, a soja é um dos principais produtos agrícolas, com uma produção significativa e crescente ao longo dos anos. Em 2021, a produção de soja no Brasil foi estimada em aproximadamente 135 milhões de toneladas, um aumento significativo em comparação com anos anteriores. Esse crescimento na produção se deve, em grande parte, às condições climáticas favoráveis e aos avanços tecnológicos no setor agrícola (Conab, 2021; Hymowitz, 2004; Sediyaama *et al.*, 2009).

A soja exerce uma influência marcante na economia do Brasil, destacando-se como uma das principais commodities exportadas pelo país. Em 2020, a exportação de soja rendeu cerca de 28,6 bilhões de dólares, o que corresponde a aproximadamente 13% do total das exportações brasileiras. A relevância da soja para a economia brasileira também é evidente na criação de empregos e no desenvolvimento de várias áreas agrícolas, com destaque para as regiões Centro-Oeste e Sul do país (Mdic, 2021). Além de sua relevância econômica, a soja possui um valor nutricional considerável. É uma fonte rica em proteínas, óleos e fibras, sendo amplamente utilizada tanto na alimentação humana quanto na produção de ração animal (Fukushima, 2011).

2.2 A cultura da soja

Desde o século XX até os dias de hoje, a cultura da soja passou por transformações significativas. A soja foi inicialmente cultivada em pequena escala no Brasil e com técnicas rudimentares. Entretanto, a partir da década de 1960, a cultura começou a se expandir de forma acelerada, impulsionada pela introdução de novas tecnologias e práticas agrícolas mais eficientes (Gazzoni; Dall'Agnol, 2018b).

Nas primeiras décadas, os agricultores cultivavam variedades tradicionais de soja adaptadas às condições locais, porém tinham limitações quanto à produtividade e resistência a doenças. Com o avanço da pesquisa agrícola, a produtividade das lavouras de soja aumentou significativamente, visto que foram introduzidas cultivares melhoradas e a aplicação de técnicas modernas, como rotação de culturas e manejo integrado de pragas. A partir da década de 1990, a adoção de variedades transgênicas transformou a produção de soja no Brasil. Resistentes a herbicidas e a algumas pragas, essas variedades proporcionaram maior eficiência no controle de plantas daninhas e pragas, resultando em aumentos significativos na produtividade e redução dos custos de produção (Gazzoni; Dall'Agnol, 2018; Sedyama *et al.*, 2009).

A soja exerce um papel crucial na economia brasileira, contribui significativamente para a geração de empregos e para o desenvolvimento socioeconômico de diversas regiões do país sendo uma das principais commodities exportadas. Em 2020, as exportações de soja geraram cerca de 28,6 bilhões de dólares, representando aproximadamente 13% do total das exportações brasileiras. A produção de soja no Brasil foi estimada em aproximadamente 135 milhões de toneladas em 2021, consolidando o país como um dos maiores produtores e exportadores mundiais do grão. Essa expansão está diretamente ligada à utilização de sementes melhoradas, à mecanização agrícola e ao avanço das práticas de manejo sustentável (Mdic, 2021; Conab, 2021).

O avanço tecnológico e a adoção de práticas sustentáveis são essenciais para minimizar os impactos ambientais associados ao cultivo intensivo, como o desmatamento e a degradação do solo. Assim, as transformações inovadoras na cultura da soja ao longo do tempo não se limitam apenas ao campo econômico, visto que a pesquisa e a inovação continuam sendo fundamentais para garantir a sustentabilidade e a competitividade da soja brasileira no cenário global (Fearnside, 2001).

2.3 Soja Transgênica

A modificação genética de plantas é uma técnica que envolve a inserção de sequências específicas de DNA para alterar a estrutura, composição ou desenvolvimento das plantas, ou seja, é a manipulação de seu material genético para incorporar características desejadas, como resistência a pragas e tolerância a herbicidas. Portanto, essa prática tem a finalidade de aprimorar características agronômicas importantes através de modificação genética, permitindo a transferência de genes entre diferentes espécies, criando plantas transgênicas que podem expressar características que não seriam possíveis através de métodos tradicionais de melhoramento genético (Halford; Shewry, 2000; Oliveira, 2013)

As plantas transgênicas podem ser classificadas em três gerações distintas. A primeira geração é caracterizada pela introdução de genes que conferem resistência a doenças, pragas, herbicidas e estresse ambiental. A segunda, visa a melhoria nutricional dos alimentos, com a expressão de vitaminas e outros compostos benéficos. E a terceira geração, por sua vez, foca na produção de substâncias de alto valor, como fármacos, vacinas, anticorpos e hormônios (Garg *et al.*, 2018; Rocha; Marin, 2011).

Tratando-se da soja, o cultivo e produção se enquadram majoritariamente na primeira geração de transgênicos. Através da introdução da soja resistente ao herbicida glifosato, conhecida como soja Roundup Ready (RR), a soja transgênica se estabeleceu na agricultura global a partir da década de 1990. Essa soja foi desenvolvida pela Monsanto e liberada comercialmente em 1996 nos Estados Unidos. A introdução desta tecnologia permitiu o controle eficaz de ervas daninhas, facilitando o manejo agrícola e reduzindo a necessidade de herbicidas mais tóxicos (Carpenter, 2010).

O desenvolvimento de cultivares transgênicas de soja com resistência ao glifosato é um exemplo de sucesso no melhoramento de plantas para a resistência a herbicidas. De acordo com James (2014), a soja RR domina o mercado de soja transgênica, sendo plantada em mais de 90% das áreas de soja nos Estados Unidos. A adoção da soja transgênica no Brasil também foi significativa. O primeiro cultivar de soja transgênica no Brasil foi aprovado em 2003, e desde então, a área plantada com soja transgênica cresceu exponencialmente. Segundo o relatório da International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) referente ao ano de

2017, 32,7 milhões de hectares de soja transgênica foram plantados no Brasil, correspondendo a 96,5% de toda a soja cultivada no país (Cib, 2019).

2.4 Proteína Cry1AC e Soja Transgênica

Os genes transgênicos que codificam proteínas de resistência a insetos presentes na soja são, em sua maioria, derivados da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Esta bactéria, encontrada na natureza, produz proteínas durante sua esporulação que têm propriedades entomopatogênicas, como é o caso da proteína Cry1Ac (Bravo; Gill; Soberón, 2007)

A proteína Cry1Ac, assim como outras proteínas Cry, é uma δ -endotoxina cristalina que se liga a receptores específicos no sistema gastrointestinal de insetos, principalmente lepidópteros. Esses receptores estão localizados no intestino médio dos insetos, onde a proteína forma poros, levando à lise das células intestinais e, eventualmente, à morte do inseto (Parker; Feil, 2005). Essa ação é especialmente eficaz contra pragas como a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), uma das principais ameaças à cultura da soja (Kumar *et al.*, 2008).

A inserção do gene que codifica a proteína Cry1Ac em cultivares de soja tem permitido um controle mais eficiente das pragas, diminuindo a necessidade de uso de inseticidas químicos e promovendo uma agricultura mais sustentável. Esta tecnologia tem sido amplamente adotada em países produtores de soja, incluindo o Brasil, onde a soja Bt tem se mostrado eficaz na redução de perdas causadas por pragas e no aumento da produtividade (James, 2014).

Além de sua eficácia no controle de pragas, a soja transgênica que expressa Cry1Ac tem demonstrado ser segura para consumo humano e animal. Estudos de avaliação de risco indicam que a proteína Cry1Ac não é tóxica para mamíferos, aves e outros organismos não-alvo, o que contribui para a aceitação dessa tecnologia por consumidores e órgãos reguladores (Betz; Hammond; Fuchs, 2000).

2.5 Métodos de Detecção de Expressão de Genes Transgênicos

Para garantir a qualidade, pureza e segurança de vegetais geneticamente modificados, foram desenvolvidos diversos métodos para detectar ou identificar a presença e expressão de genes transgênicos de forma qualitativa ou quantitativa

Estes métodos são essenciais para a regulamentação e monitoramento de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) (Mazzola *et al.*, 2013, Conceição; Moreira; Binsfeld, 2006)

Um dos métodos mais comuns é a utilização de primers e marcadores específicos para a amplificação de sequências de DNA por meio da PCR (Polymerase Chain Reaction). Após a amplificação, a detecção é realizada via eletroforese, permitindo identificar a presença de transgenes no genoma. Esse tipo de teste é conhecido por sua alta repetibilidade, facilidade de execução e baixo custo relativo (Silva *et al.*, 2015).

Quando a reação de amplificação de DNA é realizada por PCR em tempo real (qPCR), há a possibilidade de quantificar o número de cópias do gene ou da sequência de DNA testada. No entanto, métodos baseados na análise de DNA apenas confirmam a presença da sequência alvo, sem fornecer informações sobre sua expressão, a menos que seja obtida uma cópia de DNA a partir de RNA mensageiro (mRNA), utilizando a técnica de RT-PCR (Reverse Transcription PCR) (Ferreira *et al.*, 2017).

Os testes de bioensaio analisam diretamente a expressão fenotípica de interesse, expondo o organismo a um estímulo ou condição específica e observando a resposta após um período determinado. Este método simula as condições em larga escala, mas a expressão fenotípica e a análise dos resultados podem ser influenciadas por fatores ambientais (Melo *et al.*, 2008).

Além desses, existem métodos de detecção de proteínas, como o Western Blot, cromatografia, imunocromatografia e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Estes métodos são utilizados para detectar e quantificar proteínas específicas expressas pelos genes transgênicos, fornecendo informações diretas sobre a expressão proteica (Santos *et al.*, 2012).

2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA

O teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é uma técnica imunoenzimática essencial para a detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos em várias amostras biológicas. Este método é amplamente utilizado no diagnóstico clínico de diversas doenças, incluindo hepatite, HIV e, mais recentemente, COVID-19 (Torane; Shastri, 2008; Dhamad; Rhida, 2020; Wang *et al.*, 2020; Sajid *et*

al., 2016). A técnica baseia-se na interação específica entre antígenos e anticorpos. Anticorpos, ou imunoglobulinas, são proteínas produzidas pelos linfócitos B em resposta à presença de antígenos, que são moléculas estranhas ao organismo. Essas imunoglobulinas se ligam especificamente aos epítomos, que são regiões específicas dos antígenos, conferindo alta especificidade aos ensaios (Baker *et al.*, 2020).

Os anticorpos utilizados no teste ELISA são conjugados a enzimas que catalisam reações que resultam em uma mudança de cor, permitindo a detecção visual ou fotométrica. A intensidade da cor gerada é diretamente proporcional à quantidade de antígeno ou anticorpo presente na amostra, permitindo a quantificação precisa desses componentes (Hasan *et al.*, 2019).

Existem diferentes modalidades de ELISA, incluindo os formatos direto, indireto, sanduíche e competitivo. No ELISA direto, o antígeno é fixado diretamente à superfície da placa e detectado por um anticorpo conjugado a uma enzima. Essa metodologia é rápida e de baixo custo, mas geralmente menos sensível (Chen *et al.*, 2020). No ELISA indireto, o antígeno é ligado à placa e a detecção é feita através de um anticorpo primário específico seguido por um anticorpo secundário conjugado a uma enzima. Este formato é amplamente utilizado para detectar anticorpos em amostras (Kumar *et al.*, 2018).

O ELISA tipo sanduíche envolve a captura do antígeno por um anticorpo fixado à placa, seguido pela adição de um segundo anticorpo, também conjugado a uma enzima, que se liga a um epítomo diferente do mesmo antígeno. Esta abordagem é altamente sensível e específica (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020). No ELISA competitivo, a quantidade de antígeno na amostra compete com um antígeno marcado pela ligação a um número limitado de anticorpos, sendo a intensidade da reação inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra (Noguera *et al.*, 2016).

Os anticorpos utilizados no ELISA podem ser monoclonais ou policlonais. Anticorpos monoclonais são derivados de um único clone de linfócito B e são altamente específicos, reconhecendo apenas um epítomo do antígeno. Eles são produzidos em culturas de hibridoma, resultantes da fusão de linfócitos B com células de mieloma. Em contraste, anticorpos policlonais são obtidos a partir do soro de animais imunizados e reconhecem múltiplos epítomos do mesmo antígeno, proporcionando maior afinidade e robustez, mas com menor especificidade (Lipman *et al.*, 2005). As enzimas mais comumente utilizadas no ELISA incluem a peroxidase

de rábano (HRP) e a fosfatase alcalina (AP). Estas enzimas são escolhidas devido à sua capacidade de produzir sinais detectáveis e estáveis quando ligadas aos anticorpos (Konstantinou, 2017).

O teste de ELISA tem várias aplicações na agricultura. Ele pode ser usado para rastrear plantas, células ou plantas de interesse ou determinar a expressão de proteína após a transformação genética. Em produtos prontos para comercialização, o ELISA pode ser utilizado para determinar níveis de expressão de proteínas em diferentes tecidos vegetais. O teste de ELISA pode ser utilizado na produção de sementes como ferramenta de garantia da qualidade, permitindo que os produtos entregues aos clientes tenham o desempenho prometido (Stave, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Seis experimentos foram realizados durante o ano de 2024 no laboratório de qualidade de sementes da Bayer, divisão agrícola, localizada na latitude 18°56'48" S, longitude 48°09'15" W, 943m, no município de Uberlândia, Minas Gerais.

3.1 Ressuspensão dos anticorpos

Os anticorpos de captura e detecção para Cry1Ac utilizados foram produzidos e isolados pela empresa Sigma Aldrich Brasil LTDA. Ambos os anticorpos são monoclonais e foram extraídos do soro de ratos, purificados e liofilizados, e então ressuspensos em PBS 1X (NaCl 0,138M, KCl 0,0027M, Tween-20 1%, pH 7,4). Foram utilizados 1000 uL para ressuspensão do anticorpo de captura e 500 uL para o anticorpo de detecção, de modo que a concentração inicial de anticorpo de captura e detecção foram 2,0 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente. O anticorpo de detecção está ligado à enzima HRP, Horseradish Peroxidase, que reage à muitos substratos diferentes.

3.2 Obtenção do lisado proteico

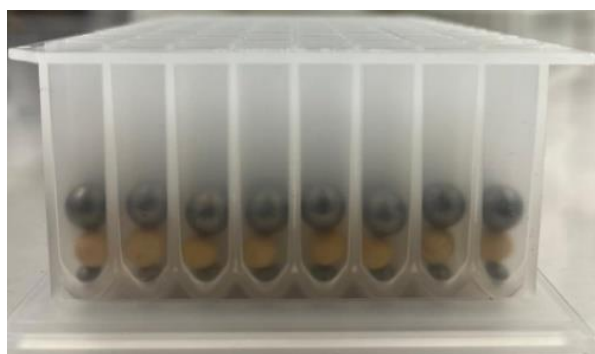
3.2.1 Extração proteica

Nos experimentos, foram utilizadas 192 amostras de sementes de soja com biotecnologia que expressam o evento MON 87701, responsável pela produção da proteína Cry1AC, sendo 96 amostras da variedade Intacta 2 Xtend (2XTD) e 96 da Intacta RR2 PRO (IPRO). Para as amostras negativas, que não contêm o evento MON 87701, foram empregadas 192 sementes de soja, incluindo 96 amostras da variedade Intacta Xtend (XTD) e 96 da Brasmax Olimpo IPRO (RR). Todas as sementes utilizadas nos ensaios foram fornecidas pela divisão agrícola da Bayer, Bayer CropScience.

Em diferentes blocos de 96 poços da fabricante Fisher Scientific, sementes de soja contendo a tecnologia que expressa a proteína Cry1AC e sementes que não expressão a proteína, foram colocadas em cada poço até que todo o bloco ficasse completo, garantindo a inexistência de poços vazios ou de poços com mais de uma

semente. Esferas de aço inoxidável de 5 mm de diâmetro foram inseridas embaixo das sementes, em cada um dos poços e esferas de 7 mm de diâmetro foram inseridas sobre cada semente. Esses blocos foram levados para a prensa hidráulica com o objetivo de esmagar as sementes, sendo que o uso das esferas de aço foi realizado para evitar o contato direto entre a prensa e as sementes, evitando a contaminação entre as amostras (Figura 1).

Figura 1— Bloco de extração de DNA de sementes de Soja.



Fonte: Autoria própria, 2024

Legenda: Disposição das sementes de soja no bloco de 96 poços para extração de DNA Cry1Ac.

Em cada um dos poços dos blocos, foram adicionados 850 μ L de solução tampão de extração PBS 1X. Em seguida, os blocos foram selados, pesados e agitados por 8 minutos. Logo após, os blocos contendo as amostras extraídas foi congelado a -80°C por 4 horas. Depois desse período, seguiu-se com o descongelamento, em estufa a 37°C , por aproximadamente 3 horas. Em seguida, os blocos foram centrifugados durante 10 minutos a 3.500 rpm para que a o lisado proteico estivesse disponível no sobrenadante e pronto para ser utilizado nos experimentos.

3.3 Experimento I: Determinação da concentração dos anticorpos

3.3.1 Titulação

O teste para determinar a melhor concentração dos anticorpos de captura e de detecção foi realizado conforme descrito por Cowther (2008). A diluição foi realizada em tubos Eppendorf de 5 mL, utilizando uma pipeta manual para transferir o conteúdo

As placas contendo os anticorpos de captura foram seladas provisoriamente e armazenadas a 4°C em período *overnight*. No dia seguinte, as placas foram lavadas em lavadora de microplaca de 384 poços com 100 µL solução-tampão PBS com 0,5% de Tween-20, por três ciclos de lavagem.

3.3.2.2 *Bloqueio*

O bloqueio das placas foi realizado adicionando 100 uL de solução de 3% m/m de leite em pó desnatado em solução de PBS e incubando durante uma hora em estufa à 37°C. Essa etapa é utilizada para bloquear os possíveis espaços que possivelmente não estariam ocupados com o anticorpo, evitando resultados imprecisos. Logo após, as placas foram lavadas em solução-tampão PBS com 0,5% de Tween-20, por três ciclos de lavagem.

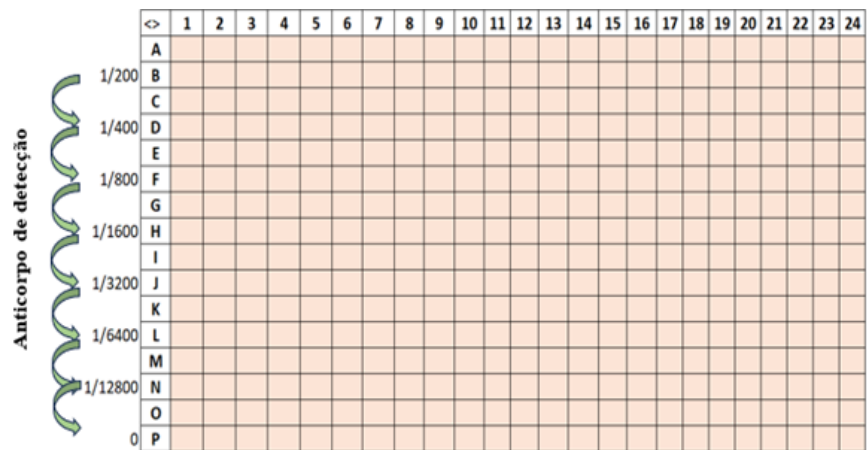
3.3.2.3 *Adição da amostra (lisado proteico)*

Em seguida foram adicionados 25µL de amostra em cada poço. Posteriormente as placas foram armazenadas em estufa à 37°C, no período de uma hora. Decorrido o período de incubação, seguiu-se novamente com a lavagem das placas (3x de 100uL de PBS por poço).

3.3.2.4 *Adição do anticorpo de detecção*

As placas receberam nas colunas (direção vertical), 25µL das diferentes concentrações do anticorpo de detecção (Figura 2B). Em seguida as placas foram armazenadas em estufa à 37°C no período de uma hora e lavadas.

Figura 2B — Mapa da disposição dos anticorpos de detecção.



Fonte: Autoria própria, 2024.
Legenda: Desenho da disposição dos anticorpos de detecção em placas de ELISA de 384 poços

3.3.2.5 Adição de substrato e leitura

Após a lavagem, foram vertidos 25 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) em cada poço das placas de ELISA. As placas foram armazenadas em local limpo, seco e sem luz durante 10 minutos, para reação entre a enzima e o substrato. Decorridos os 10 minutos, foram adicionados à placa a solução de paragem (ácido fosfórico 85%). As placas foram analisadas na leitora de placas da marca PheraStar TMG, utilizando 450 nm de comprimento de onda.

3.3.3 Análise de concentrações

Após a conclusão da metodologia do ELISA, os resultados foram analisados com base na capacidade de identificar e diferenciar as amostras positivas para a proteína Cry1Ac das negativas. Utilizaram-se duas placas que apresentaram as concentrações mais sensíveis e específicas para a proteína-alvo, permitindo a comparação entre elas em busca de diferenças estatísticas. O objetivo principal foi avaliar a viabilidade de otimizar o teste, mantendo a sensibilidade e a especificidade, ao utilizar a menor concentração possível dos reagentes (anticorpos).

3.3.4 Ponto de corte

O ponto de corte de densidade óptica para esse trabalho foi de (OD) ≤0.299, e esse foi calculado de acordo a fórmula:

$$\text{Ponte de corte} = \mu \text{ controles negativos} + 6 * DP.$$

Ambas as placas, contendo concentrações de anticorpos de captura diferentes foram utilizadas para a determinação do ponto de corte e ambas geraram o mesmo resultado. Considerando o teste entre as duas concentrações de anticorpo de captura e o ponto de corte determinado, seguiu-se com as análises estatísticas.

3.4 Experimento II: Avaliação da etapa de bloqueio

Este experimento focou na avaliação da necessidade somente da etapa de bloqueio, comparando uma placa que passou pela etapa de bloqueio e outra não. Foram selecionadas as concentrações de 1,88 µg/mL para o anticorpo de captura e 1/200 para o anticorpo de detecção, já que as demais concentrações testadas não demonstraram a sensibilidade necessária para a detecção da proteína-alvo. Na primeira placa de ELISA, todos os poços foram sensibilizados com a concentração de 1,88 µg/mL do anticorpo de captura. Após essa etapa, realizou-se o bloqueio da placa utilizando 100 µL de uma solução de 3% de leite desnatado em pó diluído em PBS-T. Em seguida, foram realizados todos os passos subsequentes do protocolo: adição do lisado proteico, anticorpo de detecção, substrato, e, por fim, a leitura dos resultados. Uma segunda placa foi preparada sob as mesmas condições da primeira (sendo sensibilizada com 1,88 µg/mL do anticorpo de captura). No entanto, nesta placa, a etapa de bloqueio não foi realizada, seguindo diretamente para os outros estágios do protocolo (adição do lisado proteico, anticorpo de detecção, substrato e leitura). Entre todas as etapas as amostras foram incubadas e lavadas.

3.5 Experimento III: Incubação da amostra junto ao anticorpo de detecção

Esse experimento avaliou a viabilidade de combinar as etapas de adição da amostra e do anticorpo de detecção, utilizando as mesmas concentrações de anticorpos do experimento I (1,88 µg/mL para o anticorpo de captura e 1/200 para o anticorpo de detecção). Foram utilizadas duas placas para comparação: na primeira, as etapas foram realizadas de forma sequencial, com a sensibilização, bloqueio, adição da amostra, adição do anticorpo de detecção, adição do substrato e, por fim, a leitura. Nesse caso, a amostra foi adicionada à placa em uma etapa, seguida pela introdução do anticorpo de detecção na etapa posterior.

Na segunda placa, a amostra foi adicionada junto ao anticorpo de detecção executando as duas etapas simultaneamente. As etapas então seguiram com: sensibilização, bloqueio, adição da amostra junto com o anticorpo de detecção, adição do substrato, e finalmente a leitura dos resultados. Entre todas as etapas as amostras foram incubadas e lavadas.

3.6 Experimento IV: Determinação da concentração dos anticorpos na condição: incubação da amostra junto ao anticorpo de detecção.

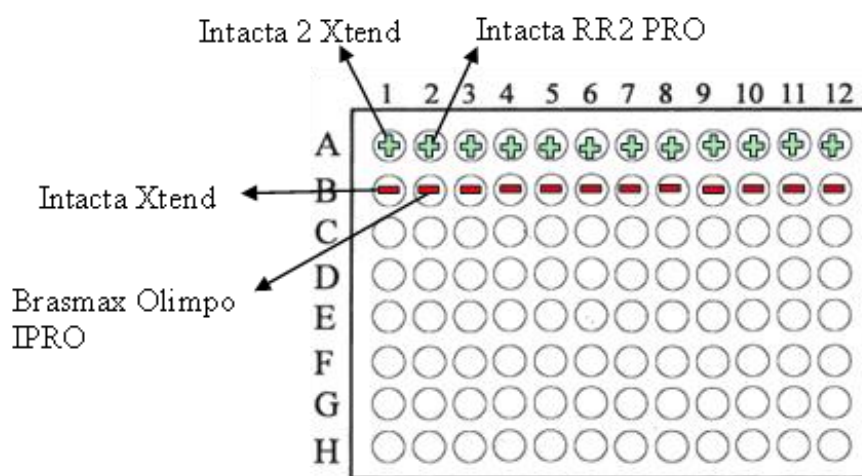
Este experimento buscou encontrar a melhor concentração para identificar a proteína Cry1Ac em sementes de soja, considerando realizar as etapas de adição da amostra simultaneamente ao anticorpo de detecção. A diluição foi feita como descrita no item 2.3.1. Em resumo, em tubos Eppendorf de 5 mL, utilizando uma pipeta manual, começou-se com uma concentração inicial de 2,0 mg/mL do anticorpo de captura, resultando em concentrações que variam de 30 µg/mL a 0 µg/mL. Para o anticorpo de detecção, foram usadas diluições a partir de 1,0 mg/mL, com concentrações de 1/200 a 1/12800. As diluições foram feitas em tampão bicarbonato de sódio e distribuídas. A sensibilização com anticorpo de captura ocorreu nas linhas da placa, seguindo com o bloqueio, a amostra foi adicionada junto com o anticorpo de detecção (distribuído nas colunas), adição de substrato e finalmente a leitura dos resultados. Entre cada etapa, as placas foram lavadas em solução-tampão PBS com 0,5% de Tween-20, por três ciclos de lavagem.

3.7 Experimento V: Especificidade

O experimento de especificidade foi conduzido com as concentrações previamente estabelecidas no item 2.3.1 do experimento I, utilizando 1,88 µg/mL para o anticorpo de captura e diluição de 1/200 para o anticorpo de detecção. As etapas do teste de ELISA seguiram a metodologia descrita por Crowther (2008). Foram analisadas 96 amostras de soja Intacta 2 Xtend e 96 amostras de soja Intacta RR2 PRO que expressam a proteína Cry1Ac, totalizando 192 amostras positivas para a proteína-alvo. Para as amostras negativas, que apenas apresentaram resistência ao glifosato, foram utilizadas 96 amostras da soja Intacta Xtend e 96 amostras da Brasmax Olimpo IPRO, resultando em 192 amostras negativas. As amostras foram

dispostas em linhas: na primeira linha, todos os poços receberam amostras positivas, com as amostras Intacta 2 Xtend nos poços ímpares e as amostras Intacta RR2 PRO nos poços pares. Na segunda linha, foram alocadas amostras negativas, com as amostras Intacta Xtend nos poços ímpares e as Brasmax Olimpo IPRO nos poços pares (Figura 3). Essa configuração foi mantida em toda a placa de ELISA. A tabela 1, traz um resumo dos 5 experimentos com relação à metodologia de Cowther (2008).

Figura 3 — Mapa da disposição das diferentes tecnologias nas sementes de soja.



Fonte: Autoria Própria, 2024.

Legenda: Desenho da disposição das amostras em placas de Elisa contendo as diferentes tecnologias presentes na semente para avaliar a especificidade do teste de Elisa para proteína Cry1Ac em sementes de soja.

Quadro 1— Esquema resumido dos experimentos I, II, III, IV e V

Metodologia de Elisa. Cowther (2008)	Experimento I (Concentração)	Experimento II Etapa bloqueio	Experimento III Anticorpo + amostra	Experimento IV (Concentração) anticorpo + amostra	Experimento IV
Sensibilização Anticorpo de captura Incubação overnight (4°C) Lavagem(PBS 05% de Tween 20) 3 X		1 2	1 2		
Bloqueio Incubação – 1 hora (37°C) Lavagem(PBS 05% de Tween 20) 3 X		1	1 2		
Adição da amostra Incubação – 1 hora (37°C) Lavagem(PBS 05% de Tween 20) 3 X		1 2	1 2		
Adição anticorpo de detecção Incubação – 1 hora (37°C) Lavagem(PBS 05% de Tween 20) 3 X		1 2	1 2		
Adição de substrato Solução stop		1 2	1 2		
Leitura		1 2	1 2		

Fonte: Autoria própria, 2024.

Descrição: O quadro contém os diferentes ensaios realizados na metodologia, facilitando o entendimento baseado no padrão ouro do teste Cowther (2008).

3.8 Análise estatística

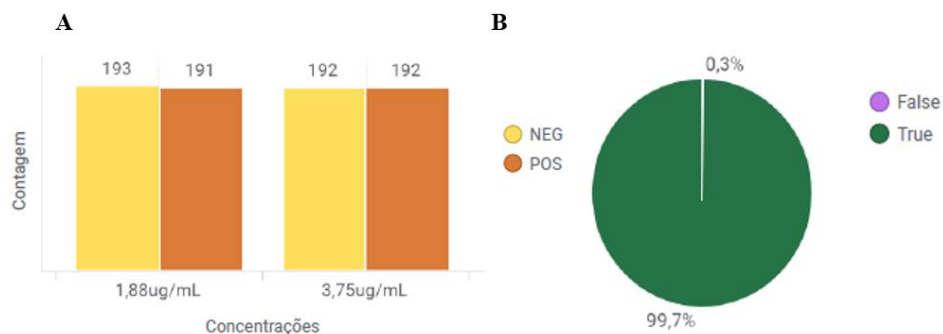
Os dados foram tabulados e organizados para análise utilizando o software R 4.1.1 (R Core Team, 2021). Para comparação da distribuição de frequências dos resultados entre as placas e dos resultados obtidos com os perfis esperados, foram utilizados testes de McNemar (função `mcnemar.test`) com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). O teste de McNemar é uma solução para comparação de proporções entre variáveis categóricas relacionadas (Comerlato *et al.*, 2020). Para comparar a especificidade na detecção de amostras negativas e positivas para Cry1Ac foram utilizados testes de proporção similares (função `prop.test`). Esse teste utilizou contagens de sucesso e falha na detecção de resultados considerando uma falha aceitável de 5%. Os gráficos e tabelas apresentados foram elaborados utilizando o Software TIBCO Spotfire Analyst 11.4.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na definição do ponto de corte, foi possível identificar, entre as diferentes concentrações testadas, que 1,88 µg/mL e 3,75 µg/mL foram as concentrações mínimas ainda capazes de manter a sensibilidade e especificidade adequadas do anticorpo de captura, garantindo resultados consistentes na otimização do protocolo de ELISA. Para o anticorpo de detecção, a concentração/diluição de 1/3200 foi determinada como ideal e utilizada em todos os experimentos deste estudo. Considerando o ponto de corte ($OD \leq 0.299$), as demais concentrações apresentaram valores de densidade óptica com sensibilidade e especificidade insuficientes para a detecção precisa da proteína, sendo então desconsideradas nos ensaios. Valores com baixa detecção podem resultar em falsos negativos para a proteína alvo, além de permitir reações cruzadas com outras proteínas, levando a falsos positivos. Greiner e Gardner (2000) destacaram que sensibilidade e especificidade são critérios essenciais na definição de testes diagnósticos. Diante da relevância desses parâmetros, o cálculo do ponto de corte torna-se crucial para o desenvolvimento e/ou otimização de protocolos de ELISA (Carmanati *et al.*, 2003).

As concentrações 1,88 µg/mL e 3,75 µg/mL foram comparadas entre elas e os testes de McNemar mostraram que não houve diferença significativa entre as concentrações testadas ($p=0,99$) (Figura 4), indicando que é possível utilizar a menor concentração de anticorpo de captura testado (1,88ug/mL) e conseguir discriminar as amostras contendo ou não a proteína Cry1AC.

Figura 4 — Representação gráfica das concentrações.

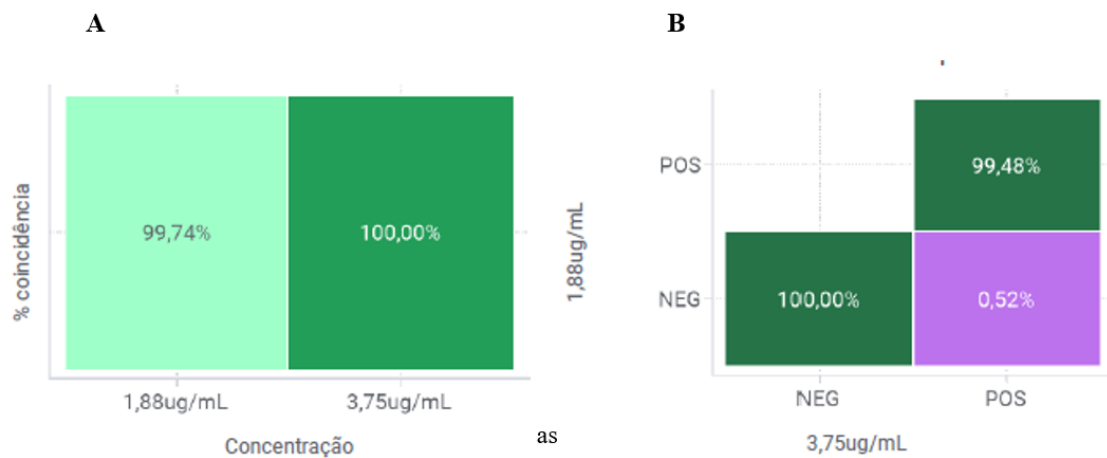


Fonte: Autoria própria, 2024.

Legenda: Resultados da comparação entre as placas com concentrações de 1,88 ug/mL e 3,75 ug/mL em referência ao perfil esperado. (A) Número de amostras detectadas como positivas e negativas. (B) Coincidência de mais de 99% entre as duas concentrações.

Ao se comparar a coincidência entre o resultado obtido e o resultado esperado não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de 1,88 ug/mL e 3,75 ug/mL ($p=0,99$) (Figura 5). A coincidência foi alta para ambas as concentrações, onde 1,88 ug/mL foi de 99,74 % e 3,75 ug/mL 100% (Figura 2A). Considerando amostras com e sem a expressão da proteína Cry1Ac, houve uma coincidência de 99,48% e 100% respectivamente (Figura 2B).

Figura 5 — Representação gráfica da comparação das concentrações.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Legenda: Resultados da coincidência entre o resultado obtido e o resultado esperado ($p=0,99$) sem diferença estatística (A). Relação entre as amostras reativas para proteína Cry1Ac e não reativas (B).

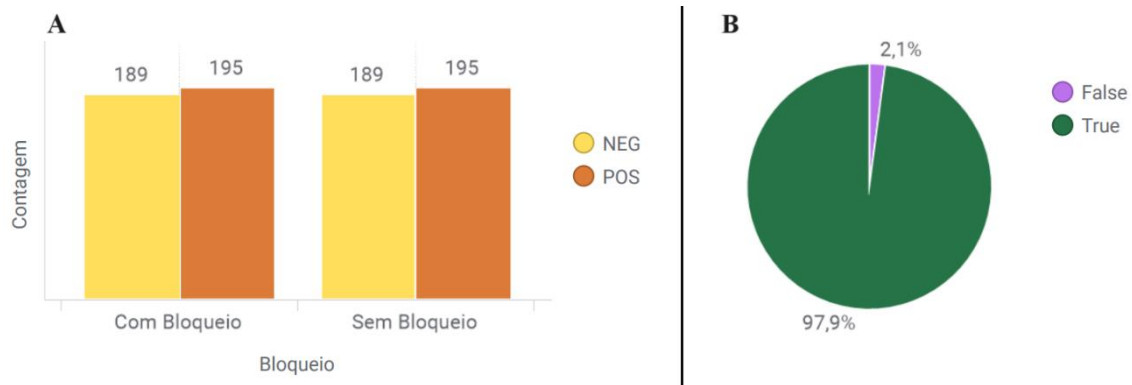
Na literatura há trabalhos de desenvolvimento e otimização de protocolos de ELISA proteína-específica que encontraram concentrações de anticorpo de captura próximas às encontradas nesse trabalho com boa especificidade. Liu *et al.* (2020), utilizaram a concentração de 2,0 ug/mL e 1,0 ug/mL, para anticorpos de captura e detecção, em desenvolvimento de um protocolo de ELISA para detecção de proteína VIP3Aa e Mir162 em amostras de milho.

No presente trabalho, provou-se que concentrações inferiores a essas podem ser utilizadas para detectar a proteína Cry1Ac em sementes de soja. A utilização de baixas concentrações de anticorpos devem ser ideais para garantir uma ligação adequada ao antígeno sem gerar ruído de fundo excessivo e normalmente as baixas concentrações são utilizadas para reduzir reatividade cruzada com outras proteínas, além de reduzir os custos.

A etapa de bloqueio foi avaliada quanto à necessidade. As respostas das análises estatísticas mostraram que a concentração de 1,88 ug/mL, quando é

comparada entre as placas com as etapas com e sem bloqueio teve um valor de $p \leq 0,005$, indicando que não houve diferença significativa entre as placas avaliadas, com 97,9% de coincidência entre as placas (Figura 6).

Figura 6 — Representação gráfica do uso da etapa de bloqueio

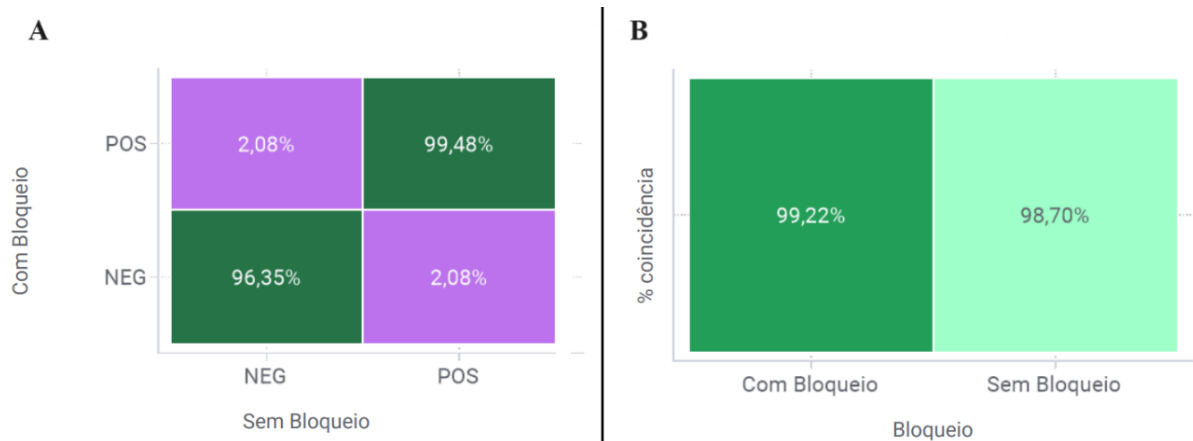


Fonte: Autoria própria, 2024.

Legenda: Número de amostras detectadas como positivas e negativas para proteínas cry1AC (A), sendo esperadas 195 amostras positivas e 189 amostras negativas com bloqueio e 195 positivas e 189 negativas sem bloqueio. Resultados da comparação entre as placas bloqueio e sem bloqueio em amostras positivas e negativas para proteína Cry1Ac e não reativas (B).

Ao realizar a análise de coincidência entre as placas (Figura 7A) com e sem bloqueio, não foi detectada diferença significativa ($p=0,99$), verificando-se coincidência entre elas de 99,48% quando as amostras são positivas e 96,35% quando as amostras são negativas. Avaliando a coincidência das placas com e sem bloqueio com o resultado obtido e o esperado, foi observado que também não houve diferenças significativas entre elas, apresentando coincidência de 99,22% e $p=0,25$ para placas com bloqueio e 98,70% e $p=0,99$ para placa sem bloqueio (Figura 7B).

Figura 7— Representação gráfica do uso da etapa de bloqueio na especificidade.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Legenda: Porcentagem da coincidência da comparação das placas com e sem bloqueio para amostras positivas e negativas para Cry1AC (A) resultado da coincidência da comparação entre as etapas de bloqueio e sem bloqueio comparadas com o perfil esperado. (B) Coincidência entre as etapas de bloqueio e sem bloqueio com o perfil esperado.

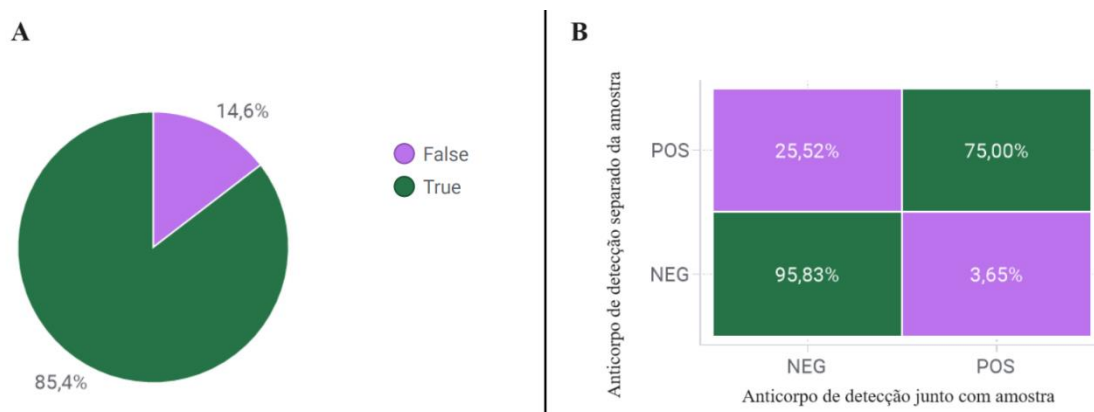
Os resultados da avaliação da necessidade da etapa de bloqueio mostraram que para esse protocolo é possível eliminá-la, sem perda de sensibilidade e especificidade. Ahirwar *et al.* (2015) investigaram a necessidade do bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) em protocolos de Elisa e seus resultados indicaram que a etapa de bloqueio poderia ser eliminada sem comprometer os resultados quando o tampão de lavagem contém Tween 20 (PBS-T). Apesar da etapa de bloqueio ser importante para eliminar a possibilidade de ligações inespecíficas, em protocolos que são utilizadas amostras com baixa reatividade cruzada, essa etapa pode ser ajustada ou eliminada (Lewis; Easthope, 2024). O tampão PBS utilizado para a lavagem das placas, é tipicamente utilizado pois mantém a isotonicidade, uma vez que a maioria das reações antígeno-anticorpo são ideais nessas condições.

Neste estudo, utilizamos o tampão Tween 20 PBS-T em todas as etapas de lavagem, escolhendo proteínas com baixa probabilidade de reações cruzadas. Considerou-se uma concentração mínima de anticorpos que garantisse uma alta afinidade específica pela proteína alvo, reduzindo a formação de fundo, o que é consistente com os trabalhos citados. Ao eliminar a etapa de bloqueio, é possível reduzir em pelo menos 37 minutos o tempo total necessário para a condução do protocolo.

Já para avaliar a otimização do protocolo também vislumbrando redução do tempo, os resultados mostraram que houve diferença significativa ($p < 0.05$), com coincidência $> 85\%$ (Figura 8A) quando comparadas as placas que tiveram a

incubação separada da adição do anticorpo de detecção das placas que tiveram a incubação da amostra junto ao anticorpo de detecção. As amostras que são negativas para Cry1Ac apresentaram uma alta taxa de coincidência (95,83%), e as amostras que são positivas para proteína Cry1Ac apresentaram uma taxa de apenas 75% de coincidência (Fig. 8B).

Figura 8 — Representação gráfica da comparação entre a adição juntamente e separada da amostra ao anticorpo de detecção.



Fonte: Autoria própria, 2024.

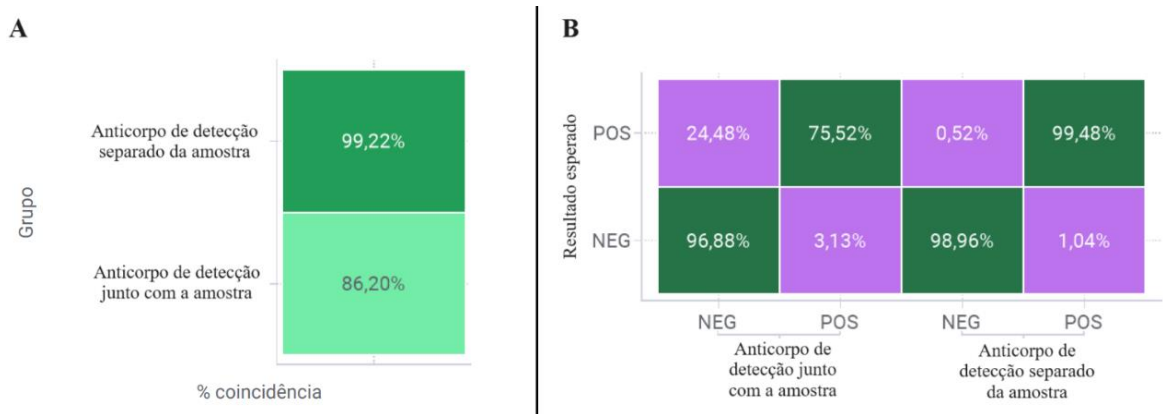
Legenda: Resultado da comparação entre as placas, onde uma teve a adição do anticorpo de detecção junto à amostra e na outra essa incubação foi realizada em etapas distintas (A). Comparação entre as placas com bloqueio e sem bloqueio em relação às amostras positivas e negativas para proteína Cry1Ac (B).

Analisando o resultado esperado em relação ao obtido, na figura 9 A podemos observar que houve diferença significativa quando comparamos a adição do anticorpo de detecção adicionado separado da amostra, com (99,22%, $p < 0.05$) com taxas de coincidência acima de 95% para amostras positivas e negativas para Cry1Ac, e quando comparamos com a placa que foi adicionado o anticorpo de detecção simultaneamente às amostras, a taxa de coincidência é de apenas 86,20% ($p < 0.05$) (Figura 9A) com sucesso de detecção de 75,52% para as amostras positivas e de 96,88% para amostras negativas (Figura 9B).

Uma das explicações desse resultado é a possibilidade de o anticorpo de detecção ter se ligado antes de ocorrer a ligação entre o anticorpo de captura e o a proteína alvo, resultando na falta de ligação do anticorpo de detecção, onde essa competição dos anticorpos é desfavorável para confiabilidade do teste. Além disso, a incubação simultânea poderia diminuir a especificidade da reação, pois o anticorpo

secundário pode-se ligar a outro componentes presentes na amostra, podendo levar à erros na interpretação dos resultados (Lewis; Easthope, 2024).

Figura 9 — Representação gráfica da especificidade quanto a adição juntamente e separada da amostra ao anticorpo de detecção.



Fonte: Autoria própria, 2024.
Legenda: Resultado da coincidência comparando as placas com anticorpo de detecção adicionado junto à amostra com os resultados esperados (A). Resultado da coincidência comparando as placas com anticorpo de detecção adicionado junto à amostra e separado para positivas e negativas para proteína Cry1Ac com os resultados esperados (B).

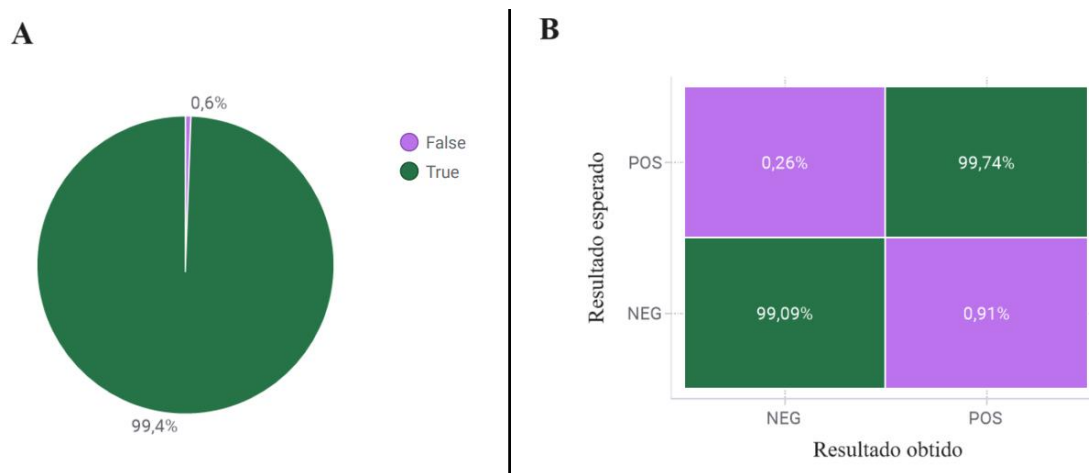
Esses resultados indicam que não é possível seguir com a incubação das amostras juntamente com o anticorpo de detecção, utilizando uma concentração de 1,88ug/mL do anticorpo de captura e de 1/3200 do anticorpo de detecção, pois geraram resultados com baixa sensibilidade e especificidade para proteína Cry1Ac em soja.

Diante dos resultados obtidos nesses ensaios, com o objetivo de desenvolver um protocolo de ELISA otimizado, foi demonstrado que é possível utilizar uma baixa concentração de 1,88 µg/mL de anticorpo de captura e detecção, garantindo a eficiência e especificidade do teste para a proteína Cry1Ac em sementes de soja. Também foi observada a otimização com a eliminação da etapa de bloqueio com redução do tempo de condução do protocolo, pois quando comparada ao perfil esperado, o valor de $p \leq 0,005$ não foi significativo. No entanto, no ensaio que visou reduzir o tempo de incubação da amostra juntamente com o anticorpo de detecção, houve diferença estatística ($p < 0,05$), não sendo possível a otimização dessa etapa do protocolo. Em vista desse resultado, foi realizado um novo teste de titulação buscando determinar a concentração ideal para o protocolo nessa condição.

Os resultados do segundo teste de titulação foram realizados eliminando a etapa de bloqueio uma vez que já foi observado nos testes anteriores que não houve diferença significativa quando comparada com a presença do bloqueio no protocolo.

Os dados obtidos demonstraram que a concentração de 7,5 ug/mL, dentre todas as concentrações testadas descritas no item 3.3.1 para o anticorpo de captura, foi a mais sensível para o protocolo na condição com o anticorpo de detecção junto à amostra. Já em relação a concentração/diluição do anticorpo de detecção foi encontrado o valor de 1/800 de acordo metodologia descrita por Crowther (2008). Ao comparar a coincidência da taxa de detecção com o perfil esperado em amostras onde o anticorpo de detecção foi adicionado junto com as amostras, não foi observada diferenças estatísticas entre a concentração de 7,5 ug/mL ($p=0,18$), apresentando uma coincidência total de 99,4% (Figura 10A). A taxa de detecção para amostras positivas para Cry1Ac foi de 99,74% e para amostras negativas foi de 99,09% (Figura 10B) evidenciando uma alta especificidade para o teste.

Figure 10 — Representação gráfica da especificidade quanto a adição juntamente da amostra com anticorpo de detecção.



Fonte: Autoria própria, 2024.

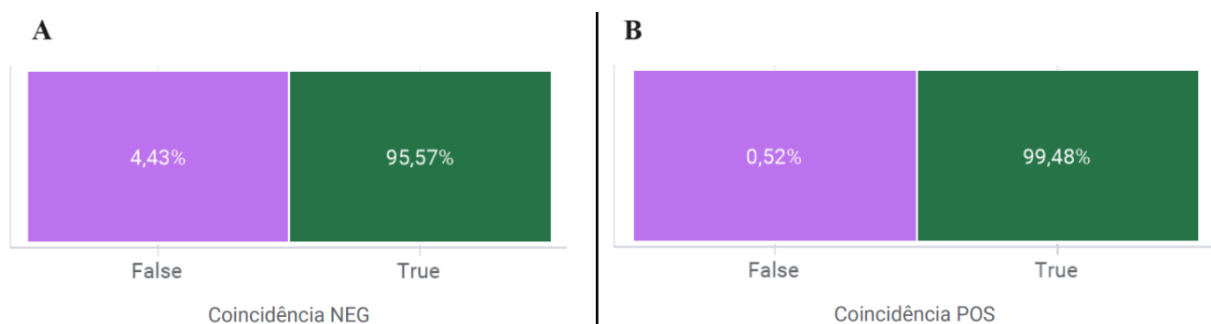
Legenda: Resultados da coincidência da concentração de 3,75 em referência ao perfil conhecido com anticorpo de detecção adicionado junto às amostras (A). Resultado para taxa de detecção de amostras positivas para cry1Ac e para amostras negativas para cry1Ac (B).

Esses resultados, nos mostram que nas 7,5 ug/mL de anticorpo de captura e a diluição de 1/800 para anticorpo de detecção, que é possível incubar os anticorpos de detecção e amostra simultaneamente, reduzindo o tempo do protocolo em mais 37 minutos. Isso pode ser explicado devido à alta concentração do anticorpo de captura, que se liga em níveis satisfatórios ao complexo devido à sua alta afinidade pelos sítios

de ligação da proteína alvo, não deixando possibilidade de ligação pelo anticorpo de detecção deixando-o disponível para se ligar ao complexo antígeno-anticorpo, mantendo assim a especificidade do teste.

Para a especificidade, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas $p (=0,18)$ e foram considerados ótimos devido aos altos valores de coincidência vistos quando comparados ao perfil esperado. Tivemos uma taxa de sucesso de 95,57% (Fig. 11A) de confirmação para amostras negativas e uma alta especificidade de 99,48% (Fig. 11B) para amostras positivas, evidenciando a especificidade do teste para amostras de sementes de soja positivas para Cry1Ac eliminando reações cruzadas com outras tecnologias. Trabalho semelhante foi desenvolvido por Dong *et al.* (2020) quando testaram a especificidade VL – VL para proteínas Cry1 em uma absorbância de 450 nm, como neste trabalho.

Figura 11 — Representação gráfica da especificidade de sementes de soja para Cry1Ac.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Legenda: Resultado da coincidência com relação ao perfil de amostra conhecido para tecnologias negativas para expressão de Cry1Ac (XTD e RR) (A) e amostras positivas para tecnologias que expressam proteínas Cry1Ac (2XTD e IPRO) (B).

5 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nesse trabalho, podemos observar que a otimização do protocolo com especificidade e sensibilidade para Cry1AC em sementes de soja é possível e podemos considerar duas possibilidades. A primeira reduzindo é seguir o protocolo utilizando 1,88 µg/mL de anticorpo de captura, sem a etapa de bloqueio da placa e incubação da amostra separada do anticorpo de detecção, reduzindo o tempo e custo. A segunda possibilidade, se baseia numa redução apenas do tempo, utilizando 3,75 ug/mL de anticorpo de captura, incubando o anticorpo de detecção simultaneamente com a amostra e nesse caso, também eliminamos a etapa de bloqueio da placa.

REFERÊNCIAS

- AHIRWAR, R.; BARIAR, S.; BALAKRISHNAN, A.; NAHAR, P. BSA blocking in enzyme-linked immunosorbent assays is a non-mandatory step: a perspective study on mechanism of BSA blocking in common ELISA protocols. **RSC advances**, v. 5, n. 121, p. 100077-100083, 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ra/c5ra20750a#!divAbstract>. Acesso em: 02 out 2024.
- BAKER, M.; LODGE, J.; CHISHOLM, R. H.; HARRIS, M. A.; ROBINSON, J. A. An ELISA method for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0238977, 2020.
- BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and Advantages of Bacillus Thuringiensis-Protected Plants to Control Insect Pests. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 156-173, out. 2000. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/rtph.2000.1426>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S02732300000914260?via%3Di> hub. Acesso em: 07 jul. 2024.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Agrícola e Pecuário 2015-2016 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília: Mapa/SPA, 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/plano-agricola-pecuario/plano-agricola-e-pecuario-2015-2016.pdf>. Acesso em 07 jul. 2024.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 423-435, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1857359/>. Acesso em: 12 set. 2024.
- BROOKES, G.; BARFOOT, P. GM crop technology use 1996-2018: farm income and production impacts. **Gm Crops & Food**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 242-261, 24 jul. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21645698.2020.1779574>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7518751/>. Acesso em: 15 set. 2024.
- CARMINATI, R.; BAHIA, R.; COSTA, L. F. de M.; PAULE, B. J. Ad.; VALE, V. L.; REGIS, L.; FREIRE*, S. M.; NASCIMENTO*, I.; SCHAER*, R.; MEYER*, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, p. 89-93, 01 jan. 2003. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/4256>. Acesso em: 23 jul. 2024.
- CARPENTER, J. E. Peer-reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 319-321, abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0410-319>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt0410-319>. Acesso em: 02 out. 2024.

CHEN, Z.; ZHANG, Z.; ZENG, X.; LI, Y.; LIU, Y.; WANG, T. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 10, p. 1735-1741, 2020.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Adoção de culturas transgênicas no Brasil e no mundo: principais resultados e tendências**. São Paulo: CIB, 2019.

CLAPPER, Gina M.; KURMAN, Lulu. Immunoassay applications in grain products and food processing. **Immunoassays in Agricultural Biotechnology**, p. 241-256, 2011.

COÊLHO, J. D. Soja. **Caderno Setorial ETENE**, v. 9, n. 361, nov. 2024. . Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/revista/cse/article/view/3105/2190>. Acesso em: 02 set. 2024

COMERLATO, P. H.; SANTOS, S.; ZIEGLER, N.; CAPP, E.; NIENOV, O. **H. Bioestatística Quantitativa Aplicada: métodos estatísticos para desfechos qualitativos**. Porto Alegre: Ufrgs, 2020 . Cap. 6, p. 101-124, 2020. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/213116/001117616.pdf>. Acesso em: 02 set. 2024.

CONAB.COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 12 jun. 2024.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, Â. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 315-324, fev. 2006. Fap UNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000100053>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/gkkn5wdbzbZv5dMmtjDYMJ/>. Acesso em: 02 out. 2024.

CROWTHER, John R. **The ELISA guidebook**. Springer Science & Business Media, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-60327-254-4>.

DEVINE, G. J.; FURLONG, M.I J. Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agriculture And Human Values**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 281-306, 19 jun. 2007. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10460-007-9067-z>.Disponivel em: <https://ideas.repec.org/a/spr/agrhuv/v24y2007i3p281-306.html>. Acesso em 02 out. 2024

DHAMAD, A. E.; RHIDA, M. A. A. COVID-19: molecular and serological detection methods. **PeerJ**, v. 8, p. e10180, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.10180>. Disponível em: <https://peerj.com/articles/10180/>. Acesso em 10 out. 2024.

DONG, S.; GAO, M.; Guan, L.; Zhang, H.; Wang, Y. Liu, B.; Li, P. Qiao, K.; Liu, X. Zhang, C . Construction, Expression, and Identification of Double Light Chain (V_L-V_L) Antibody from a Unique Bt Cry1-Specific Monoclonal Antibody. **Food Anal. Methods** 13, 1570–1582 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01754-y> Food Analytical Methods, 2020, 13, 1570-1582. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7547594/>. Acesso em 23 out. 2024

EMBRAPA Soja. **Tecnologias de Produção de Soja** – Região Central do Brasil 2016 e 2017. Londrina: Embrapa Soja, 2015. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1123928/1/SP-17-2020-online-1.pdf>. Acesso em 12 dez. 2024.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO.FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 30 set. 2024.

FEARNSIDE, P. M. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. **Environmental Conservation**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 23-38, mar. 2001. Cambridge University Press (CUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s0376892901000030>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/231866206_Soybean_Cultivation_as_a_Threat_to_the_Environment_in_Brazil. Acesso em: 30 set. 2024.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.; PIROVANI, C. P. M.; FRANCO, D. A. **Biotechnologia e marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2017.

FUKUSHIMA, D. Soy proteins for food production: A review of Japanese research. **Food Reviews International**, v. 27, n. 3, p. 142-156, 2011.

GARG, A. K.; KIM, J.-K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. do; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 99, n. 25, p. 15898-15903, 27 nov. 2002. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.252637799>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC138536/>. Acesso em: 15 set. 2024.

GAZZONI, D. L.; D.'A., A. **Soja no Brasil e no Mundo**: uma síntese das principais informações da cultura. Londrina: Embrapa Soja, 2018a.

GAZZONI, D. L.; D.'A., Amélio. **A saga da soja**: de 1050 a.c. a 2050 d.c. Brasília, Df: Embrapa, 2018. (978-85-7035-807-3). Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1093166>. Acesso em 02 out 2024

GREINER, M; GARDNER, I.A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, [S.L.], v. 45, n. 1-2, p. 3-22, maio 2000. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-5877\(00\)00114-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-5877(00)00114-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167587700001148?via%3Dihub>. Acesso em: 22 out. 2024.

HALFORD, N. G; SHEWRY, P. R. Genetically modified crops: methodology, benefits, regulation and public concerns. **British Medical Bulletin**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 62-73, 1 jan. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1258/0007142001902978>. Disponível em: <https://academic.oup.com/bmb/articleabstract/56/1/62/388066?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 17 jul. 2024.

HASAN, M.; MAHMUD, S.; ALI, S.; ALI, M.; FARD, M. K.; KHAN, M. S. ELISA and its applications: A review. **Journal of Medical and Biological Science**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2019.

HÖFTE, H; WHITELEY, H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 242-255, jun. 1989. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2666844/>. Acesso em 17 jul 2024.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 58, n. 3, p. 326-353, 2004.

JAMES C. Global Status of Commercialized. **Biotech/GM Crops**: 2014. Ithaca, Ny: Founder And Emeritus Chair Of Isaaa, 2014. Disponível em: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/>. Acesso em: 02 nov. 2024.

KUMAR, S.; NYGAARD, P. I.; MOLLER, K. K.; RASMUSSEN, M. A.; FALCK, C.; CHERIAN, S.; PETERSEN, H. H. A comparative study of ELISA methods for the detection of hepatitis E virus antibodies in pigs. **Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 86-95, 2018.

KUMAR, S.; PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; ROY, M.; SINGH, A. Cry proteins: A toolkit for effective insect pest control. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2008.

LANDAU, E. C.; SILVA, G. A. da; MOURA, L.; HIRSCH, A.; GUIMARÃES, D. P. Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas: produtos de origem vegetal. Brasília, Df: **Embrapa**, v. 2, cap. 37, p. 1215-1239 2020.

LEWIS, M; EASTHOPE, E. **ELISA Guide; Part 1: Introduction to ELISA, Formats and Signal Amplification**. Disponível em: <https://www.jacksonimmuno.com/secondary-antibody-resource/immuno-techniques/elisa-guide-part-1/>. Acesso em: 22 out. 2024.

LEWIS, M; EASTHOPE, E. **ELISA Guide; Part 2: The ELISA Protocol**. Disponível em: <https://www.jacksonimmuno.com/secondary-antibody-resource/immuno-techniques/elisa-guide-part-2/>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LIPMAN, N. S.; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J.; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. **Iilar Journal**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 258-268, 1 jan. 2005. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15953833/>. Acesso em: 23 set. 2024.

LIU, W.; LIU, X.; LIU, C.; ZHANG, Z.; JIN, W. Development of a sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA to detect Vip3Aa in genetically modified crops. **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 42, n. 8, p. 1467-1478, 5 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-020-02854->

9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32140882/>. Acesso em: 15 out. 2024.

MAZZOLA, P. G.; PIZZURRO, G.; MAZZOLA, S. M. **Análise e Detecção de OGMs: técnicas de biologia molecular e suas aplicações**. São Paulo: Editora Unesp, 2013.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS- MDIC. **Exportações Brasileiras de Soja**. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br>. Acesso em: 12 dez. 2024

MELO, M. M.; MACHADO, C. C.; SILVA, A. L.; OLIVEIRA, L. E. A.; COSTA, R. R. A. Bioensaios: aplicações e desafios em biotecnologia. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 561-568, 2008.

MIKLOS, J. A.; ALIBHAI, M. F.; BLEDIG, S. A.; CONNOR-WARD, D. C.; GAO, A. - G.; HOLMES, B. A.; KOLACZ, K. H.; KABUYE, V. T.; MACRAE, T. C.; PARADISE, M. S. Characterization of Soybean Exhibiting High Expression of a Synthetic Bacillus thuringiensis cry1ATransgene That Confers a High Degree of Resistance to Lepidopteran Pests. **Crop Science**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 148-157, jan. 2007. Wiley.DOI: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2006.07.0463>

NOGUERA, P.; IVASK, A.; KURZAWA-ZEGOTA, M.; DOHERTY, A.; TOVAR, F.; VO-DINH, T. Competitive ELISA for the detection of endotoxin in environmental water samples. **Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 1817-1824, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT- OECD. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing Bacillus thuringiensis - Derived Insect Control Protein. Paris: OECD, 2007. Disponível em: https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2010/11/safety-assessment-of-transgenic-organisms-volume-3_g1g12055/9789264095434-en.pdf, Acesso em 27 jun. 2024.

OLIVEIRA, R. C. **Introdução à biotecnologia agrícola**. São Paulo: Editora XYZ, 2013.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress In Biophysics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 91-142, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079610704000033?via%3Dihub>. Acesso em: 12 set. 2024.

ROCHA, R. B.; MARIN, S. Cultivares de plantas transgênicas e seus benefícios agrônômicos e ambientais. In: MIRANDA, Z. (Org.). **Biotecnologia e meio ambiente: práticas, desafios e perspectivas**. São Paulo: Roca, 2011. p. 83-112

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LUNN, M.; BARBOSA, V. L.; NOGUERA, P.; VO-DINH, T. Development of a sandwich ELISA for the detection of zearalenone in cereals and its application to food safety analysis. **Food Control**, v. 108, p. 106806, 2020.

SAJID, M.; ILYAS, M.; KHAN, M. K.; KHAN, H.; CHANG, J.; XIE, Q. ELISA: a rapid and sensitive tool for detecting COVID-19 antibodies. **Diagnostics**, v. 6, n. 4, p. 45-52, 2016.

SANTOS, R. R.; LIMA, D. P.; SILVA, M. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Métodos de detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 367-375, 2012.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja**: do plantio à colheita. Viçosa: UFV, 2009.

SHAH, K.; MAGHSOUDLOU, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. **British Journal Of Hospital Medicine**, [S.L.], v. 77, n. 7, p. 98-101, 2 jul. 2016. Mark Allen Group.DOI: <http://dx.doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.c98>.

Disponível em:

<https://www.magonlinelibrary.com/doi/full/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>. Acesso em: 17 jul. 2024.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 1, p. 13-21, 2001.

SILVA, G. L.; PACHECO, G.; MENDES, M. S.; CARVALHO, S. T. Técnicas moleculares aplicadas à identificação de transgenes em plantas. **Revista Brasileira de Biotecnologia**, v. 18, n. 1, p. 25-33, 2015.

STAVE JW. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. **J AOAC Int.** 2002 May-Jun;85(3):780-6. PMID: 12083275.Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12083275/>. Acesso em 17 jul 2024.

TORANE, V.P.; SHASTRI, J.S. Comparison of ELISA and rapid screening tests for the diagnosis of HIV, hepatitis B and hepatitis C among healthy blood donors in a tertiary care hospital in Mumbai. **Indian Journal Of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 284, 2008. Elsevier BV.DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.42071>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18695340/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

USDA.Soybean Explorer: soybean 2022 world production: 378,160 (1000 mt).

Soybean 2022 World Production: 378,160 (1000 MT). Disponível em:

https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=2222000&sel_year=2022&rankby=Production. Acesso em: 02 set. 2024.

WANG, Y.; ZHANG, L.; LIU, X.; LI, X.; WANG, Z.; ZHANG, D.; WANG, H. Development of an ELISA for the detection of antibodies against SARS-CoV-2. **Journal of Virological Methods**, v. 285, p. 113943, 2020