



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANGÉLICA TIEME ISHIKAWA

**HIBRIDOMA OTA.1:**

ANTICORPO ANTI-OTA NO DESENVOLVIMENTO DA  
COLUNA DE IMUNOAFINIDADE E APLICAÇÃO ASSOCIADA  
À QUALIDADE E SEGURANÇA DE VINHO

ANGÉLICA TIEME ISHIKAWA

**HIBRIDOMA OTA.1**

ANTICORPO ANTI-OTA NO DESENVOLVIMENTO DA  
COLUNA DE IMUNOAFINIDADE E APLICAÇÃO ASSOCIADA  
À QUALIDADE E SEGURANÇA DE VINHO

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

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka

Londrina  
2012

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

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

I79h Ishikawa, Angélica Tieme.  
Híbrido OTA.1 : anticorpo anti-OTA no desenvolvimento da  
coluna de imunoafinidade e aplicação associada à qualidade e  
segurança de vinho / Angélica Tieme Ishikawa. – Londrina, 2012.  
102 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.  
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-  
Graduação em Ciência de Alimentos, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. Vinho e vinificação – Microbiologia – Teses. 2. Alimentos –  
Indústria – Teses. 3. Anticorpos monoclonais – Teses. 4. Teste  
imunoenzimático – Teses. 5. Resveratrol (Antioxidantes) – Teses. I. Hirooka,  
Elisa Yoko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:577.1

ANGÉLICA TIEME ISHIKAWA

**HIBRIDOMA OTA.1:**

ANTICORPO ANTI-OTA NO DESENVOLVIMENTO DA COLUNA DE  
IMUNOAFINIDADE E APLICAÇÃO ASSOCIADA À QUALIDADE E  
SEGURANÇA DE VINHO

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª. Idjane Santana de Oliveira  
UFPE – Recife – PE

---

Profª Drª. Suzana Lucy Nixdorf  
UEL – Londrina – PR

---

Profª Drª. Elisa Yoko Hirooka  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 28 de maio de 2012.

*Agradeço primeiramente à Deus, por permitir  
desfrutar dessa vida com amor, saúde e paz,  
guiando-me e dando-me sabedoria.*

*Aos meus pais, Mário e Harue, por estarem  
presentes em toda caminhada, dando-me amor,  
carinho, conselhos valiosos e todo suporte que  
necessito.*

*À minha querida irmã Mariana, amiga, incansável  
ouvinte, alegrando meus dias e dando forças.*

*Aos amigos queridos e familiares.*

*Meus sinceros agradecimentos!*

*Muito Obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

*À professora Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka pela oportunidade de realização deste trabalho, confiança, incentivo, auxílio, força, compreensão e valiosa orientação, meu eterno agradecimento;*

*À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos e Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pela oportunidade de aprendizado, colaborando com o meu crescimento profissional;*

*À chefia e coordenação do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela atenção e colaboração;*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo;*

*À Fundação Araucária Paraná (nº14/2009), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (CNPq/MAPA/SDA; nº 064/2008) e Rede Nanobio/CAPES (nº 23/2009) pelo apoio financeiro;*

*Ao professor Dr. Osamu Kawamura de Kagawa University, Japão, pelo fornecimento de células Hibridoma OTA.1 para realização deste trabalho;*

*A professora Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano pela disponibilidade de trazer o hibridoma;*

*A professora Dr<sup>a</sup>. Elisabete Y. S. Ono pelo auxílio, ensinamentos, paciência e amizade;*

*A professora Dr<sup>a</sup>. Suzana Lucy Nixdorf pelo fornecimento de amostras de vinho Bordô de Paraná, pelos conselhos, ajuda e disponibilidade;*

*A professora Dr<sup>a</sup>. Marta Benassi pelos conselhos valiosos, ensinamentos, prontidão e disponibilidade;*

*A professora Dr<sup>a</sup>. Maria Josefa Santos Yabe pela disponibilidade e ensinamentos valiosos.*

*À doutoranda Cássia Reika Takabayashi pelos ensinamentos, auxílio, conselhos, prontidão, sobretudo à amizade, alegrando e tornando os dias de laboratório mais prazerosos.*

*A Dr<sup>a</sup>. Dani Luce Doro da Silva pela sua contribuição científica, permitindo que eu pudesse dar continuidade ao trabalho presente, além de conselhos e amizade.*

*Aos produtores e ao Sr. Odilson Peliser da EMATER pela coleta de amostras de vinho Bordô;*

*Ao mestrando Thiago Montagner Souza pela coleta de vinho tinto argentino, e principalmente, pelo incentivo, força e amizade, tornando o dia-a-dia mais alegre.*

*À Patrick Juliano Alves Gomes Wietchorek e Jéssica Gubany Sanches pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e prontidão.*

*À Dr<sup>a</sup>. Luciana Pereira Bernd, por permitir ser sua estagiária durante o seu doutoramento, repassando-me conhecimentos, ensinamentos que foram e são importantes nessa etapa da minha caminhada, além de sua amizade.*

*À estagiária Lígia Manoel Martins, presente desde o início do mestrado, à estagiária Agata Barradas e Renata Yumi pela ajuda, prontidão, paciência, força e amizade, tornando mais prazeroso e alegre o trabalho no laboratório.*

*Aos estagiários, Artur Kikuchi Bagatin, Lívia Médici Montanheiro, Alessandra Marcon, Maria Tereza Fernandes, Bárbara, que auxiliaram e apoiaram, além da amizade.*

*A Jayme Toledo e Edmar Oliveira, pela contribuição científica permitindo o enriquecimento deste trabalho.*

*Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Neusa C. dos Santos, Elza Youssef, Berenice, Sandra Rezende, Alessandra, Rubens Borges Santos, Maria Alice Carlos, Célia Primo e Dona Marília.*

*Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia Nelson J. Rodriguez e Elda Jonas Aguiar pelo auxílio e colaboração.*

*À Jaqueline G. Bordini e Lucas Bissoqui, pela troca de experiências, conselhos, e sobretudo amizade.*

*Aos colegas de trabalho, Wagner E. Risso, Tatiana A. Miguel, Joice Sifuentes dos Santos, Suzy Sayuri kurokawa, Leonardo Fonseca Maciel, Ana Lúcia Felício, Cátia Yokoyama, Cíntia Handa, Marsilvio Filho, Luciane Yoshiara, Michel Kanemaru, pelo auxílio e amizade.*

## **AGRADECIMENTO PESSOAL**

*Aos meus pais, Mário Shigueo Ishikawa e Harue Ishikawa por terem me dado à vida, pelo amor, compreensão, dedicação, força, além da oportunidade de estudo.*

*À minha querida irmã, Mariana Sayuri Ishikawa pela amizade, força, companheirismo, alegria e compreensão.*

*À minha avó Hiroko Morita Koarata pela paciência e apoio.*

*À minha prima Liene Satie Koarata, pela presença constante em 2011, com seus conselhos preciosos e amizade, tornando a caminhada mais fácil.*

*Aos meus amigos, Cristian Roberto Marcucci, Luiz Fernando Veríssimo, Braúlio Albuquerque, Raíssa Bonfante, Marianne Shirai, Tahis Regina Baú, Érika Kushikawa, Daniele Honorato, Marcela Lika Kobayashi, Marinês Corso, Maria Rita Alaniz Porto, Gervásio Hitoshi, Douglas Xavier, Vanessa Michelan Silva, Viviane Gevezier da Costa, Stéphany Watzel, Paula Félix Melges, Vanessa França Vindica, Vivian Cervantes, André Kikuchi Bagatin, Diogo Gimenes Pedrollo, Kátia Rocha, Eduardo Henrique Maschio, pela amizade, alegria e companheirismo.*

*Aos amigos do programa de Patologia experimental, Denise Turini Gonzalez, Aline Santana, Ana Paula Cheirubim, Fernando Pinheiro Neto, Wellington Contier e Rafael pela força e amizade, fundamentais para conclusão da etapa final do mestrado.*

*A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

O ser humano

...

Ele se farta de ser criança e têm pressa por  
crescer

E depois suspira por voltar a ser criança  
Primeiro, perde a saúde para ter dinheiro,  
E logo em seguida, perde o dinheiro para  
recuperar a saúde

Pensa tão ansiosamente no futuro que se descuida  
do presente,

E assim, nem vive o presente e nem o futuro  
Vive como se fosse morrer

E morre como se não tivesse vivido.

Dalai Lama

ISHIKAWA, Angélica Tieme. **Hibridoma OTA.1:** anticorpo anti-OTA no desenvolvimento da coluna de imunoafinidade e aplicação associada à qualidade e segurança de vinho. 2012. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

O consumo moderado de vinho é recomendado baseado em efeito benéfico à saúde especialmente contra radicais livres, destaque ao resveratrol. O monitoramento na cadeia produtiva de vinho deve ser executado por método rápido, sensível e específico, evitando contaminação por ocratoxina A (OTA). Considerando o emprego de bioferramentas, com destaque a coluna de imunoafinidade (CIA) na extração/concentração do analito de interesse e o ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), como base para avanço tecnológico, a exemplo de biossensor, procedeu-se o cultivo de Hibridoma OTA.1 produtor de anticorpo monoclonal (AcM) anti-OTA. O cultivo de Hibridoma OTA.1 foi iniciado em meio RPMI 1640 suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) e L-glutamina, a 37 °C sob 5% CO<sub>2</sub>, e gradualmente substituído por meio Hibridoma-Serum Free Medium (H-SFM) nas proporções 15, 30, 50, 75, 80 e 100%. O enriquecimento com 7 mmol L<sup>-1</sup> de L-glutamina e cuidado especial em etapa inicial de cultivo, propiciou adaptação e expansão celular. O AcM obtido foi precipitado com sulfato de amônio a 60 % de saturação, dialisado e empregado na confecção de 6 CIAs experimentais, imobilizando 5 mg de AcM 100 % H-SFM (CIA 1 e 2); 75:100 % H-SFM (1:1) (CIA 3, 4 e 5) e 75% H-SFM (CIA 6) em um mL de suporte Affi-gel 10, com modificações na metodologia padrão. A Taxa de imobilização variou de 77,43±6,39 a 97,55±0,24 %, sendo a CIA 6 desenvolvida com AcM 75 % de H-SFM dialisado em PBS 0,015 mol L<sup>-1</sup>, com acoplamento a 4 °C/24 h, apresentou alta atividade anti-OTA por i-ELISA, sugerindo que proteínas inerentes ao próprio cultivo favoreceram a imobilização de AcM. Em paralelo, vinho argentino elaborado a partir de *Vitis vinifera* (n=26), bem como o vinho paranaense, de *Vitis Labrusca*- Bordô (n=34), foram avaliados perante contaminação de OTA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, Limite de detecção- LD =0,05 ng mL<sup>-1</sup> e Limite de quantificação - LQ= 0,07 ng mL<sup>-1</sup>) e ELISA competitivo indireto (ic-ELISA, LD= 0,17 ng mL<sup>-1</sup> e LQ= 0,32 ng mL<sup>-1</sup>); além de característica de qualidade avaliada por capacidade antioxidante (CAO), *trans*-resveratrol e parâmetros cromáticos (L\*-luminosidade, C\*-croma e h<sub>graus</sub>-tonalidade cromática) foram analisados em 60 amostras. Apenas uma amostra (0,12 ±0,01 ng mL<sup>-1</sup>) apresentou contaminação de OTA por CLAE, e 11 por ic-ELISA, com nível de contaminação abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira e Comunidade Européia (2 ng mL<sup>-1</sup>). A detecção falso-positivo de OTA por ic-ELISA foi explicado pela relação de *trans*-resveratrol e OTA (Análise de Componentes Principais -ACP), mostrando interferência de matriz. O vinho elaborado com Bordô apresentou média de CAO 4,57 mmol L<sup>-1</sup>, enquanto o vinho elaborado com *V. vinifera*, 8,35 mmol L<sup>-1</sup>. O *trans*-resveratrol foi detectado em 57 amostras de 60, sendo o nível em vinho Argentino (1,35 mg L<sup>-1</sup>) mais baixo em relação ao vinho Bordô (3,33 mg L<sup>-1</sup>) (p<0,05). O vinho de Paraná apresentou maior luminosidade em relação ao argentino, i.e., cor mais clara, entretanto valores de croma e tonalidade cromática não diferiram estatisticamente (p>0,05). Os vinhos sul-americanos mostraram perfil interessante apresentando níveis alto de antioxidante e baixa contaminação por OTA. Por outro lado, nível elevado de *trans*-resveratrol atuou como interferente em ic-ELISA resultando em falso-positivo, o conhecimento dessa influência permitirá aperfeiçoar o emprego dessa bioferramenta sensível aplicado ao vinho.

**Palavras-chaves:** Vinho tinto. Ferramenta imunoquímica. Ocratoxina A. Resveratrol. Cor

ANGÉLICA TIEME ISHIKAWA. **Hybridoma OTA.1: mAb anti-OTA in immunoaffinity column development and the associated application in quality and safety wine.** 2012. 102p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, 2012.

## ABSTRACT

Moderate consumption of wine is recommended based on beneficial effect on health, with emphasis on resveratrol against free radical. The monitoring of wine in the production chain should be performed by rapid, sensitive and specific method, avoiding contamination by ochratoxin A (OTA). Whereas the use of biotools, specially the immunoaffinity column (IAC) in the extraction/concentration of the analyte of interest and ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), as a basis for technological advanced, such biosensor, we proceeded to the Hybridoma OTA.1 cultivation producing monoclonal antibody (mAb) anti-OTA. The Hybridoma OTA.1 cultivation was started in RPMI 1640 medium supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS) and L-glutamine at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>, and gradually replaced by 15, 30, 50, 75, 80 and 100 % of Hybridoma-Serum Free Medium (H-SFM). The enrichment with 7 m mol L<sup>-1</sup> L-glutamine in initial stage cultivation promoted adaptation and cell expansion. The mAbs obtained was precipitated with ammonium sulfate at 60 % saturation, dialyzed and used in the confection of 6 experimental IACs with 5 mg of Mab 100 % (IAC 1 and 2); 75:100 % (IAC 3,4 and 5) and 75 % H-SFM (IAC 6) on one mL of Affil-gel 10, with modification in standard methodology. The rate of immobilization ranged from 77.43 ± 6.39 to 97.55 ± 0.24 %, the developed IAC 6 prepared with mAb produced in 75 % H-SFM, dialyzed in 0.015 mol L<sup>-1</sup> PBS, with coupling step performed at 4 °C/24 h, showed higher performance concerning anti-OTA activity evaluated by indirect ELISA, suggesting that proteins involved on own cultivation probably favored the mAb immobilization. In parallel, the Argentinean wine produced with *Vitis vinifera* (n=26), as well as Paraná wine produced with *Vitis labrusca*- Bordeaux (n=34), were evaluated concerning OTA contamination by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Limit of detection - LD = 0.05 ng mL<sup>-1</sup> and Limit of quantification - LQ = 0.07 ng mL<sup>-1</sup>) and indirect competitive ELISA (ic-ELISA, LD = 0.17 ng mL<sup>-1</sup> and LQ = 0.32 ng mL<sup>-1</sup>); also quality characteristic targeted on antioxidant capacity (AC), *trans*-resveratrol and chromatic parameter (L\* - brightness, C\* - chroma e h° - hue) were determinate a total of 60 samples. Only one sample (0.12 ± 0.01 ng mL<sup>-1</sup>) showed OTA contamination by HPLC and 11 samples by ic-ELISA, with levels below the limit established by Brazilian legislation and European Community (2 ng mL<sup>-1</sup>). The OTA detection by ic-ELISA was explained with the relationship of *trans*-resveratrol and OTA (Principal Components Analysis - PCA), showing the influence of matrix interference. The Bordeaux wine showed AC mean of 4.57 mmol L<sup>-1</sup>, while the same profile analysis in *V. vinifera* showed mean of 8.35 mmol L<sup>-1</sup>. The *trans*-resveratrol was detected in 57 out of 60 samples, the Argentina wine samples (1.35 mg L<sup>-1</sup>) showed lower *trans*-resveratrol level than Bordeaux wine (3.33 mg L<sup>-1</sup>) (p < 0,05). The Paraná wine showed higher brightness in relation to Argentinean wine, i.e., lighter color, however chroma and hue values did not differ statistically (p > 0,05). The South-American wines showed interesting profile concerning high level of antioxidants in detriment to lower OTA contamination. On other hand, high *trans*-resveratrol level acted as interference in ic-ELISA resulting in false positive, knowledge of this influence will improve the use of the sensitive biotool.

**Key words:** Red wine. Immunochemical tool. Ochratoxin A. Resveratrol. Color

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Análise de agrupamento
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>AC</b>	<i>Antioxidant capacity</i>
<b>AcM</b>	Anticorpo Monoclonal
<b>AcP</b>	Anticorpo Policlonal
<b>ACP</b>	Análise de componentes principais
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>BSA</b>	Soro Albumina Bovino
<b>CAO</b>	Capacidade antioxidante
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CG</b>	Complexo de Golgi
<b>CIA</b>	Coluna de Imunoafinidade
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil, radical livre
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>HPIAC</b>	<i>High Performance Immunoaffinity Chromatography</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>H-SFM</b>	<i>Hybridoma – Serum Free Medium</i>
<b>IAC</b>	<i>Immunoaffinity column</i>
<b>ic-ELISA</b>	ELISA competitivo indireto
<b>i-ELISA</b>	ELISA indireto
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgG-HRP</b>	Imunoglobulina G – <i>Horse Radish Peroxidase</i>
<b>KLH</b>	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
<b>KLH</b>	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
<b>mAb</b>	<i>Monoclonal antibody</i>
<b>MIP</b>	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>OTA-BSA</b>	Ocratoxina A- <i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>OTC</b>	Ocratoxina C
<b>OT<math>\alpha</math></b>	Ocratoxina $\alpha$
<b>OT<math>\beta</math></b>	Ocratoxina $\beta$
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>PBST</b>	Tampão Fosfato Salino Tween
<b>PCA</b>	<i>Principal Components Analysis</i>
<b>RAI</b>	Radioimunoensaio
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RV</b>	Resveratrol
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TROLOX</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> –Estrutura química de resveratrol. a) trans-resveratrol, b) cis-resveratrol. ....	22
<b>Figura 2</b> –O sistema de cor de Munsell em três dimensões a) Luminosidade, b) Luminosidade e tonalidade cromática e c) Luminosidade e croma.....	24
<b>Figura 3</b> –Representação esquemática do sistema CIELAB.....	25
<b>Figura 4</b> –Estrutura química de ocratoxinas. ....	27
<b>Figura 5</b> –Biossíntese de ocratoxina A. ....	28
<b>Figura 6</b> –Tecnologia de Hibridoma para produção ilimitada de anticorpo monoclonal. ....	32
<b>Figura 7</b> –Anticorpo. a) diagrama esquemático da molécula de anticorpo. b) Regiões determinantes de complementaridade (CDR1, CDR2, CDR3).....	33
<b>Figura 8</b> –Procedimento de limpeza e concentração do analito de interesse.....	34
<b>Figura 9</b> –Esquema de ELISA competitivo indireto.....	37
<b>Figura 10</b> –Análise de componentes principais .....	41
<b>Figura 11</b> –Fluxograma do projeto.....	43
<b>Figura 12</b> –Reativação de Hibridoma OTA.1 e adaptação gradual em meio RPMI 1640 com redução de SFB.....	49
<b>Figura 13</b> –Expansão de Hibridoma OTA.1 para produção de AcM em meio sintético H-SFM. ....	50
<b>Figura 14</b> –O AcM anti-OTA empregado na confecção de CIA. ....	52
<b>Figura 15</b> –Confecção de seis colunas de imunoafinidade baseado em suporte Affigel 10 e AcM anti-OTA.....	53
<b>Figura 16</b> –Cultivo e manutenção de Hibridoma OTA.1 produtor de anticorpo anti-OTA.....	64
<b>Figura 17</b> –Segundo cultivo de Hibridoma OTA.1.....	65
<b>Figura 18</b> –CIA desenvolvida em coluna de polipropileno (Muromac Columns, Japão) com 5mg de Ac por mL de gel/0,5 mL de gel. ....	66
<b>Figura 19</b> –Perfil eletroforético de AcM em SDS-PAGE.....	66
<b>Figura 20</b> –Atividade anti-OTA nas etapas de confecção de CIA com 5 mg/mL de gel. ....	67
<b>Figura 21</b> –Correlação de CLAE e ic-ELISA para determinação de OTA em vinho tinto e branco (n=14). ....	83

<b>Figura 22</b> –OTA, CAO, trans-resveratrol e parâmetros cromáticos: representação gráfica em duas dimensões (CP1 e CP2) envolvendo 26 amostras argentinas e 34 paranaenses.....	85
<b>Figura 23</b> –OTA, CAO, trans-resveratrol e parâmetros cromáticos: representação gráfica em duas dimensões (CP1 e CP2) envolvendo 34 amostras de vinho paranaense. ....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –Critério para determinação de ocratoxina A pela legislação da Comunidade Européia (2006).....	30
<b>Tabela 2</b> –Caracterização de CIA confeccionada com 5 mg de Ac em suporte Affigel 10 .....	68
<b>Tabela 3</b> –OTA em vinho tinto argentino (safra 2009-2010) e paranaense (safra 2009-2011) analisado por CLAE e ic-ELISA. ....	83
<b>Tabela 4</b> –Capacidade antioxidante e trans-resveratrol em vinho tinto argentino (safra 2009 -2010) e paranaense (safra 2009-2011).....	84
<b>Tabela 5</b> –Parâmetro cromático: luminosidade (L*), croma (C*) e tonalidade cromática (hgraus) em vinho tinto argentino (safra 2009-2010) e paranaense (safra 2009-2011).....	84
<b>Tabela 6</b> –Correlação entre variáveis de vinho total e paranaense (safra 2009-2011).....	87

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	19
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
3.1 VITIVINICULTURA BRASILEIRA .....	20
3.2 ANTIOXIDANTE: RESVERATROL EM VINHO.....	21
3.3 COR .....	23
3.4 MICOLOGIA DE UVA: <i>ASPERGILLUS NIGER</i> VAN THIEGHEM E <i>ASPERGILLUS</i> <i>CARBONARIUS</i> (BAINIER) THOM .....	25
3.5 OCRATOXINA.....	26
3.6 METODOLOGIA ANALITICA NA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA.....	30
3.7 METODOLOGIA ANALITICA BASEADA EM IMUNOQUÍMICA .....	31
3.7.1 Hibridoma Produtor de Anticorpo.....	31
3.7.2 Coluna de Imunoafinidade .....	33
3.7.3 <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i> (ELISA) para Determinação de Ocratoxina A.....	36
3.8 AVANÇOS NA IMUNOTÉCNICA: BIOSENSOR E ESTABILIZAÇÃO DE SÍTIO ATIVO PARA AUTOMAÇÃO.....	38
3.9 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS .....	39
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
4.1 MATERIAL .....	42
4.1.1 Infra-Estrutura .....	42
4.1.2 Vinho Tinto .....	42
4.1.3 Hibridoma Linhagem OTA.1 .....	42
4.2 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	42

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1 HIBRIDOMA OTA.1 UTILIZADO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI- OTA PARA DESENVOLVIMENTO CIA AFFI-GEL 10 PARA MONITORAMENTO DE OCRATOXINA A.....	44
5.1.1 Introdução.....	45
5.1.2 Material e Métodos.....	47
5.1.2.1 Material, meio de cultura, reagente e equipamento.....	47
5.1.2.2 Hibridoma linhagem OTA.1 .....	48
5.1.2.3 Cultivo de hibridoma OTA.1 produtor de AcM anti- OTA .....	48
5.1.2.3.1 <i>Reativação e adaptação gradual no meio RPMI 1640 (redução de SFB)</i> .....	48
5.1.2.3.2 <i>Expansão celular: produção de AcM IgG no meio sintético H-SFM</i> .....	49
5.1.2.4 Congelamento lento para preservação de hibroma anti-OTA .....	50
5.1.2.5 Confeção de CIA Affi-gel 10 com AcM produzido .....	50
5.1.2.6 Avaliação da eficiência do acoplamento .....	55
5.1.2.7 Metodologias adicionais empregadas durante e após o cultivo de Hibridoma OTA.1	55
5.1.2.8 Soluções.....	57
5.1.2.9 Análise estatística .....	57
5.1.3 Resultados e Discussão.....	57
5.1.3.1 Cultivo de Hibridoma OTA.1 e purificação de AcM produzido em meio sintético ...	57
5.1.3.1.1 <i>Primeiro cultivo celular (preliminar)</i> .....	58
5.1.3.1.2 <i>Segundo cultivo: otimização</i> .....	59
5.1.3.2 Otimização de coluna de imunoafinidade baseado em suporte Affi-gel 10 .....	61
5.1.4 Conclusão .....	63
5.2 QUALIDADE (CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, <i>TRANS</i> -RESVERATROL, COR) E SEGURANÇA (OCRATOXINA A) EM VINHO TINTO DA ARGENTINA E DO PARANÁ, BRASIL .....	69
5.2.1 Introdução.....	70
5.2.2 Material e Métodos.....	71
5.2.2.1 Material, reagente e equipamento.....	71
5.2.2.2 Vinho tinto.....	72
5.2.2.3 Hibridoma linhagem OTA.1 .....	72
5.2.2.4 Cultivo de hibridoma OTA.1 e purificação de AcM anti-OTA .....	72
5.2.2.5 Extração de OTA em vinho para determinação em ELISA competitivo indireto.....	73
5.2.2.6 Determinação de OTA em vinho por ELISA competitivo indireto .....	73

5.2.2.7 Extração de OTA em coluna de imunoafinidade para determinação em CLAE.....	74
5.2.2.7.1 <i>Determinação de OTA por cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	74
5.2.2.8 Determinação da capacidade antioxidante por método de DPPH .....	75
5.2.2.9 Análise de resveratrol por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (CLAE- UV/VIS PDA).....	75
5.2.2.9.1 <i>Análise cromática</i> .....	76
5.2.2.9.2 <i>Análise estatística</i> .....	76
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
5.3.1 Determinação de Ocratoxina A .....	76
5.3.2 Capacidade Antioxidante, Trans-resveratrol e Análise Cromática de Vinho.....	79
5.3.3 Avaliação do Conjunto de Parâmetros por ACP: OTA por ic-ELISA, Antioxidante e Análise Cromática de Vinho .....	80
5.4 CONCLUSÃO .....	82
<b>6 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>88</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) destaca a Itália, França, Espanha, Estados Unidos, Argentina, China, Austrália, Chile, África do Sul e Alemanha entre os dez maiores produtores mundiais de vinho. O Brasil consolidou-se como o quinto produtor de vinho no Hemisfério Sul, com destaque ao Estado do Rio Grande do Sul.

A vitivinicultura é uma atividade sustentável importante à pequena propriedade brasileira, permitindo nos últimos anos, a geração de emprego conduzindo a grandes empreendimentos, seja na produção de uva de mesa ou processamento. Os compostos fenólicos são apreciados na enologia pelas características organoléptica suave, sabor adstringente, influência na cor e aroma, sendo o consumo moderado associado à vida longa e saudável. Entre os fenólicos, os flavonóides e não-flavonóides de ação antioxidante contra radicais livres, reduzem doença coronária, aterosclerose, agregação plaquetária, entre outros. O resveratrol constitui o antioxidante predominante na casca e semente, cuja maior concentração em vinho tinto em relação ao rosado e branco, deve-se ao processo de fabricação.

A segurança na cadeia produtiva de vinho deve ser assegurada desde o campo, devido à ocorrência de fungos contaminantes indesejáveis pertencentes ao grupo de *Aspergillus* spp. ocratoxigênico, com ênfase para *Aspergillus niger* e *A. carbonarius*. A ocratoxina A (OTA), o principal análogo primariamente nefrotóxico, também apresenta atividade mutagênica e genotóxica, além de hepatotóxica, imunossupressiva e, possivelmente neurotóxica. A *International Agency for Research on Cancer* considera OTA como carcinogênico a animais e possível carcinógeno ao homem (grupo 2B).

A OTA é incapaz de estimular o sistema imunológico pela sua baixa massa molar. Este fato exige monitoramento constante e eficaz visando minimizar a exposição humana. A meta se torna viável com a introdução de tecnologia para a detecção de resíduo tóxico baseado principalmente em anticorpo monoclonal (AcM), caracterizado pela uniformidade e alta especificidade, oriundo da produção irrestrita de células hibridoma. O método imunoquímico surgiu como alternativa biotecnológica para minimizar o custo de análise, com destaque ao ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) e coluna de imunoafinidade para *clean-up* e pré-concentração. A química analítica isenta de solventes tóxicos e equipamentos sofisticados tem sido a meta do desenvolvimento de imunobiotecnologia aplicada ao controle de resíduos, protegendo o analista e evitando a contaminação ambiental. Novas bioferramentas têm sido desenvolvidas com ênfase a

diferentes modalidades de biosensor, MIP (*Molecularly Imprinted Polymers*), tecnologia do *Microarray* e *Luminex's x MAP*.

O intercâmbio iniciado em 1989 com o grupo experiente na produção de imunorreagentes, liderado por Dr. Osamu Kawamura (Food Hygiene Lab., Faculty of Agriculture, Kagawa University – Japão), fornece hibridomas possibilitando produção irrestrita de AcM anti-micotoxina. O fato possibilita a produção de reagentes imunobiotecnológicos destinados à obtenção de *kits* a custo acessível, imprescindíveis à informação básica na segurança alimentar, assim como visa avançar para o desenvolvimento de imunobioferramentas (biosensores).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produção de anticorpo monoclonal para emprego em coluna de imunoafinidade e aplicação em ensaio ic-ELISA, e aplicação na avaliação de qualidade de vinho argentino e brasileiro.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Cultivar hibridoma linhagem OTA.1 em meio sintético para produção de anticorpo monoclonal específico para OTA;

Purificar o anticorpo monoclonal (AcM) anti-OTA produzido pelo hibridoma OTA.1;

Otimizar CIA desenvolvida em suporte Affi-Gel 10 e AcM anti-OTA cultivado em 75 % e 100 % de Hibridoma-SFM;

Quantificar OTA por método imunoenzimático ic-ELISA e CLAE em vinho argentino e paranaense;

Avaliar capacidade antioxidante de vinho argentino e paranaense;

Quantificar *trans*-resveratrol por CLAE-PDA em vinho argentino e paranaense;

Determinar parâmetros cromáticos ( $L^*$ ,  $C^*$  e  $h_{\text{graus}}$ ) de vinho argentino e paranaense;

Correlacionar os parâmetros analisadas através de ACP e AA.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 VITIVINICULTURA BRASILEIRA

A Europa é responsável por 67,8 % da produção mundial de vinho, seguida da América (17,9 %), Oceania (5,1 %), Ásia (5,1 %) e África (4,1 %). A Europa também consome 65,5 % de vinho, seguida pela América (21,3 %), Ásia (7,8 %), África (2,9 %) e Oceania (2,5 %) (OIV, 2010). A Argentina se destaca no Hemisfério Sul com 14,8 milhões de hectolitros, seguida de Austrália (10,3 milhões), África do Sul (8,9 milhões), Chile (8,4 milhões) e Brasil (3,2 milhões) (WINES FROM BRAZIL, 2010).

A vitivinicultura brasileira ocupa área de aproximadamente 83,7 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo Sul do país, em latitude de 30° 56'15''S, até a região próxima ao Equador, em latitude de 5°11'15''S. Esta diversidade ambiental permite pólos com característica de clima temperado com um período de repouso hibernar, a exemplo de vitivinicultura tradicional no Sul e regiões de altitude do Sudeste do Brasil, localizadas nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Os pólos em áreas subtropicais com dois ciclos anuais de cultivo ocorrem no norte do Paraná e leste de São Paulo. Os pólos tropicais permitem dois e meio a três ciclos vegetativos anuais, com podas sucessivas, e estes localizados no Vale do Submédio São Francisco, no noroeste Paulista e no norte de Minas Gerais (CAMARGO *et al.*, 2011; IBRAVIN, 2011). A produção de uva ocorre nos Estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com destaque a Serra Gaúcha com 90 % da produção de vinho. Em 2010, a produção de uvas no Brasil foi 1.295.442 toneladas (t), queda em 3,74% em relação ao ano de 2009, sendo 557.888 t destinadas ao processamento e 737.554 t para o consumo *in natura* (WINES FROM BRAZIL, 2010; MELLO, 2011).

A uva brasileira destina-se a dois grupos: 55% comercializada como uva de mesa para consumo *in natura*, e 45 % destinada ao processamento industrial, correspondente à 77 % de vinho de mesa, 9 % suco de uva, e 13 % vinho fino (IBRAVIN, 2011). Embora problema climático em 2010 reduzisse produção de uva, em especial no Rio Grande do Sul, 43,07% destinou-se ao processamento, com elaboração de 24.805.713 e 195.267.979 litros de vinho fino e comum, respectivamente (MELLO, 2011; UVIBRA, 2011).

A Lei nº 10.970 de novembro de 2004 classifica o vinho em: classe (mesa, leve, fino, espumante, frisante, gaseificado, licoroso e composto), cor (tinto, rosado ou rose ou

clarete e branco) e teor de açúcar (nature, extra-brut, brut, seco, meio doce ou meio seco ou demi-sec, suave e doce) (RECEITA FEDERAL, 2011). O vinho fino é elaborado exclusivamente com *Vitis vinifera* e apresenta o teor alcoólico de 8,6 % a 14 % em volume, em processos que otimizam as características sensoriais. O vinho de mesa é elaborado de uvas de origem americana como *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos, e apresenta teor alcoólico de 7 a 14 % em volume, e produzido em pressão mínima de 1,1 a 2,0 atmosferas a 20 °C, sendo natural ou gaseificado (IBRAVIN, 2011; RECEITA FEDERAL, 2011).

Existem mais de 120 cultivares de *Vitis vinifera* e mais de 40 cultivares de uvas americanas no Brasil (CAMARGO *et al.*, 2011). As variedades viníferas utilizadas na elaboração de vinho tinto fino são Syrah, Cabernet Sauvignon, Aragonez, Pinot Noir, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, Ancellota, Touriga Nacional, Tinta Roriz, Alfrocheiro, Arinarnoua, entre outros (WINES FROM BRAZIL, 2011). Para o vinho tinto de mesa emprega-se cultivar Bordô, Isabel, Concord, Isabel precoce, BRS Rúbea e BRS Cora (EMBRAPA, 2011).

*Vitis labrusca* cultivar Bordô, originária dos EUA, foi introduzida no Rio Grande do Sul em 1839, denominada de Ives, e tem sido a base para produção de vinho Bordô, apreciado pelo mercado brasileiro, especialmente pela característica sensorial, aliado ao custo/benefício (TECCHIO *et al.*, 2007). Embora apresente baixo poder glucométrico, a expansão de cultivo até o Sul de Minas Gerais decorreu-se devido à adaptação edafoclimática, produtividade, longevidade, rusticidade, vigor moderado e alta resistência a fitopatógenos (CAMARGO, 2003; ROMBALDI *et al.*, 2004). O elevado teor de matéria corante permite o uso em corte com vinho pouco coloridos, ou permite corrigir suco elaborado com Isabel e Concord (CAMARGO, 2003).

### 3.2 ANTIOXIDANTE: RESVERATROL EM VINHO

O vinho é uma fonte importante de substância fenólica, composta de ampla variedade de flavonóides e não-flavonóides. Entre os flavonóides destacam-se os flavonóis (quercetina, kaempferol e mirecetina), 3-flavanóis (catequina, epicatequina e taninos) e antocianina (cianina). Os não-flavonóides compreendem o estilbeno (resveratrol, viniferinas, *pterostilbene* e *piceatannol*), ácido hidroxicinâmico, ácido benzóico, ácido fenólico e álcool fenólico (MALACRIDA & MOTTA, 2005; VEZZULLI *et al.*, 2007; DOPICO-GARCÍA *et al.*, 2008; ÁLEN-RUIZ *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2009).

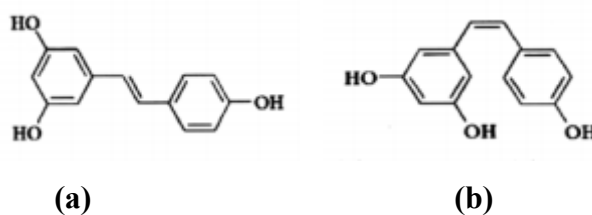
O resveratrol foi descoberto em 1963 de raízes secas de *Polygonum cuspidatum*, conhecido como *Kojokon* em japonês, e aplicado na medicina tradicional asiática

contra dermatite supurativa, gonorréia e hiperlipemia. Detectado em uva em 1976 e 1992 em vinho (FRÉMONT, 1999; SAIKO *et al.*, 2008), é uma fitoalexina natural importante no mecanismo de defesa em resposta à adversidade (irradiação UV, ozônio, cloreto de alumínio), ataque patogênico (principalmente *Botrytis cinerea*) e estresse ambiental (umidade e temperatura) (BAVARESCO; *et al.*, 2003; YANG; *et al.*, 2009). O nível de RV é influenciado pela cultivar de uva, origem geográfica e prática enológica (ROLDÁN *et al.*, 2003; SAIKO *et al.*, 2008).

O nível máximo de resveratrol ocorre 24 horas após a exposição ao estresse, declinando após 24-72 horas, resultante da ativação da oxidase do estilbeno (STERVBO *et al.*, 2007). O nível de resveratrol é particularmente alto na casca e semente de uva, sendo que a casca fresca contém 50-100 mg de RV por grama, correspondente a 5-10 % da biomassa (YANG *et al.*, 2009). A remoção de casca na fermentação de vinho branco justifica a baixa concentração de RV, se comparado ao tinto (SAIKO; *et al.*, 2008).

Os estilbenos da família Vitaceae derivam de via do ácido chiquimico-polimalônico, conforme proposto por Glangcake e Pryce e, posteriormente comprovado por Fritzmeier e Kindl (BAVARESCO *et al.*, 2003). RV apresenta nas formas isoméricas *cis*- e *trans*-resveratrol (Figura 1). O *trans*-resveratrol é o mais amplamente estudado, embora *cis*-resveratrol também apresente propriedade promotora de saúde (STERVBO *et al.*, 2007; VEZZULLI *et al.*, 2007). Lucena *et al.* (2010) detectaram níveis de 0,04 -1,26 mg/L de *trans*-resveratrol e 0,72-5,49 mg/L de *cis*-resveratrol, assim como Rodriguez-Delgado *et al.* (2002) 0,82-5,75 mg/L de *trans*-resveratrol por CLAE em vinho tinto brasileiro. Salienta-se que estes valores sejam superiores ao detectados em vinho europeu, Gerogiannaki-Christopoulou *et al.* (2006) detectaram 0,35-1,99 mg/L de *trans*-resveratrol em vinho tinto grego; Souto *et al.* (2001) detectaram níveis mais altos de *trans*-resveratrol, em vinho tinto espanhol (2,06-3,75 mg/L).

**Figura 1** –Estrutura química do resveratrol. a) *trans*-resveratrol, b) *cis*-resveratrol.



Fonte: Sautter *et al.* (2005)

O composto fenólico contribui intensamente na característica organoléptica de uva, em particular cor e adstringência (MINUSSI *et al.*, 2003). Em paralelo, intercepta radicais livres gerados no metabolismo celular (respiração aeróbia, inflamações, peroxissomos), ou por fonte exógenas (radiação gama e UV, medicamentos, dieta, cigarro), além de quelar íons cobre e ferro, catalisadores de oxidação lipídica (BIANCHI & ANTUNES, 1999; MAJO *et al.*, 2008; WELKE *et al.*, 2009). O radical livre contém número ímpar de elétrons na última camada eletrônica, conferindo alta reatividade e meia-vida curta (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BIANCHI & ANTUNES, 1999). O radical livre remove elétrons de moléculas vizinhas para estabilização atacando componentes vitais de célula constituídos de proteína, lipídeos, DNA, acelerando o envelhecimento e destruição celular (MINUSSI *et al.*, 2003). O resveratrol inibe a peroxidação lipídica (LDL, membranas), promove a quelação de cobre, eliminação de radicais livres, alteração da síntese de eicosanóides, inibição da agregação plaquetária, atividade anti-inflamatória, modulação do metabolismo lipídico, atividade anti-cancerígena e atividade estrogênica (FRÉMONT, 1999).

O antioxidante é classificado conforme mecanismo de ação em: (i) primário, se interrompe a cadeia de reação em espécies reativas de oxigênio (ROS), pela doação de elétron ou hidrogênio ao radical, convertendo-o em produtos termodinamicamente estável e (ii) secundário, se retarda a auto-oxidação por mecanismo diferente de complexação com metais, sequestro de oxigênio, absorção de radiação UV, desativação de oxigênio singlete ou decomposição de hidroperóxido (LUZIA & JORGE, 2009).

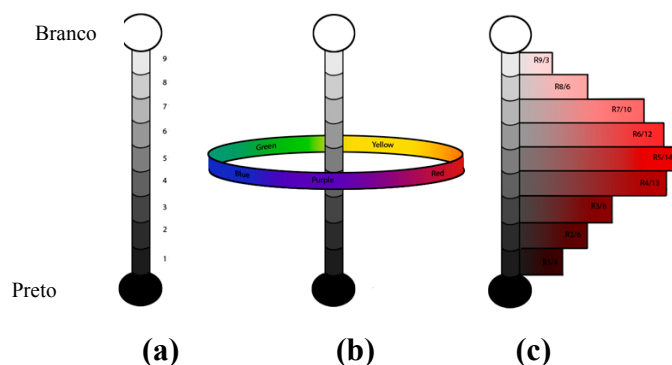
### 3.3 COR

A cor, parâmetro primordial na caracterização e qualificação de vinho, é uma sensação dependente de três fatores: natureza de luz, interação de luz com a matéria e fisiologia de olho humano (PÉREZ-MARGARINÓ & GONZÁLEZ-SANJOSE, 2003; RICARDO-DA-SILVA *et al.*, 2003). Os principais contribuintes na cor de vinho tinto são antocianinas, responsáveis por um largo espectro de cor, variando de laranja ao violeta. Durante a maturação, a cor de vinho evolui de vermelho vivo para vermelho acastanhado, resultante da reação de antocianinas com as proantocianidinas, proporcionando um incremento de pigmentos poliméricos (RICARDO-DA-SILVA *et al.*, 2003).

O sistema de cores foi desenvolvido em três dimensões: (i) luminosidade (caracteriza a cor de clara a escura, i.e., de branco a preto); (ii) tonalidade cromática (identifica a cor); e (iii) croma (indica a pureza da cor, o quanto difere de cinza)

(LOUGHREY, 2002). O sistema de cor de Munsell, criado por Albert Munsell em 1900, especifica a cor em um espaço baseado em três dimensões, com ampla aceitação e aplicação diversificada (Figura 2). Entretanto, a notação de Munsell depende do julgamento visual subjetivo de um observador humano (LOUGHREY, 2002).

**Figura 2** –O sistema de cor de Munsell em três dimensões a) Luminosidade, b) Luminosidade e tonalidade cromática e c) Luminosidade e cromas.



Fonte: Ennis (2010)

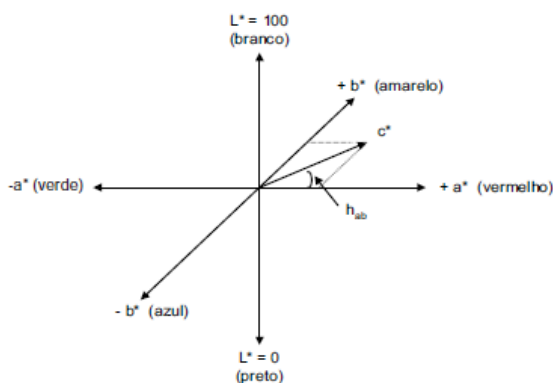
O sistema tricromático da *Comission Internationale d'Eclairage* (CIE) é baseado em três cores primárias, o vermelho, verde e azul. O sistema propôs obtenção de números que produziam medida de cor com fonte de iluminação e observador padrão, conhecidos como valores triestímulos X, Y e Z (LOUGHREY, 2002; MORITZ, 2011).

Em 1931, quando CIE desenvolveu experimentos para propor o sistema de avaliação de cor, acreditava-se que a concentração de cones era na região foveal, resultando no ângulo de visão do observador padrão de 2 graus. Em 1964, foi proposto presença de cones além da região descrita, levando em consideração a nova informação, o CIE adotou o padrão observador de 10°. Em 1965, o CIE recomendou iluminantes padrões, sendo D65 o mais importante pela representação da distribuição espectral típica do dia, com correlação cor/temperatura de 6500 K (MORITZ, 2011).

O sistema de cor CIE é fundamental para toda escala de cor instrumental, mas os valores de X, Y, e Z são difíceis de correlacionar com a cor percebida do objeto. Após adoção de sistema CIE, novos sistemas foram criadas para suprir as deficiências. A transformação no sistema CIE foi baseada na teoria de Hering, os sinais receptores do cone nos olhos foram codificados em sinais claro-escuro, vermelho-verde e amarelo-azul durante a transmissão para o cérebro. A cor vermelha e verde, assim como amarela e azul não são percebidas ao mesmo tempo (LOUGHREY, 2002).

Em 1976, um novo sistema de cor foi recomendado por CIE, o CIELAB. Uma escala uniforme, em que as diferenças entre dois pontos plotados no espaço de cor correspondem à diferença visual entre as cores plotadas. O espaço CIELAB está organizado em forma cúbica, onde o eixo  $L^*$  (luminosidade) varia de 100, representando um perfeito difusor refletindo (branco) a zero que representa o preto. Os eixos  $a^*$  (eixo verde-vermelho) e  $b^*$  (eixo azul-amarelo);  $a^*$  e  $b^*$  não tem um limite numérico específico, porém torna-se como referência o valor de 60 unidades de cor (HUNTERLAB, 2008). As coordenadas do sistema CIELAB são (i)  $L^*$  ou luminosidade; (ii)  $c^*$  ou croma, fornece medida de intensidade ou saturação da cor (Fórmula 1) e (iii)  $h_{\text{graus}}$ , corresponde à tonalidade (BORGES *et al.*, 2002).

**Figura 3** – Representação esquemática do sistema CIELAB.



Fonte: Borges *et al.* (2002)

### 3.4 MICOLOGIA DE UVA: *ASPERGILLUS NIGER* VAN THIEGHEM E *ASPERGILLUS CARBONARIUS* (BAINIER) THOM

Enfoque especial deve ser dado às espécies de *Aspergillus* spp. toxigênicas na uva, pertencentes ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Eurotiales, Família Trichocomaceae, em particular, *Aspergillus niger* Van Thieghem (1867) e *A. carbonarius* (Bainier) Thom (1916) (BATTILANI *et al.*, 2006; INDEX FUNGORUM, 2010). *Aspergillus* spp. podem ser identificadas em meio de cultura padronizado, como Agar Czapek e Agar Extrato de Malte, em temperaturas controladas a 25, 37 e 42 °C por sete dias. A identificação de espécie é observada por característica macroscópica, como coloração da massa conidial, diâmetro da colônia, presença ou ausência de escleródio, e coloração do reverso da colônia (CHALFOUN & BATISTA, 2003).

*Aspergillus niger* pertence ao subgênero *Circumdati*, seção *Nigri*, com teleomorfo ainda desconhecido (BLUMENTHAL, 2004). *A. niger* apresenta crescimento

ótimo a 35-37 °C, máxima a 45-47 °C, e forma colônia com diâmetro de 4-5 cm em ágar Czapek a 25 °C/7 dias, com estrutura basal compacta branca ou amarela, conidióforo marrom escuro a preto, sendo que a cabeça conidial preta e radiada tende a dividir em colunas com a idade. Embora utilizada na biotecnologia, determinadas cepas produzem metabólitos tóxicos incluindo ocratoxina A, *naphtho-y-pyrone*s, malforminas, detectados em alimentos secos e especiarias. A espécie é comumente isolada de solo, rizosfera de planta e semente (KLICH, 2002; SAMSON *et al.*, 2004; PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2005).

Apesar de *A. carbonarius* seja originalmente relatada em podridão de uva, a escassez na informação sobre ecologia deste *Aspergilli* negro provavelmente decorreu pela freqüente identificação como *A. niger* (ESTEBAN *et al.*, 2006). *A. carbonarius* difere *A. niger* pela produção de esporo maior, sendo isolado de cacho desde o estágio inicial do desenvolvimento de baga (SELMA *et al.*, 2008). O crescimento em ágar Czapek é lenta à 24-26°C (MYCOBANK, 2011), sendo ótimo a 30-35 °C, e inibido a < 15 °C; atividade de água (Aw) ótima varia de 0,930 a 0,987, com maior tolerância à 25–30 °C (BATTILANI; *et al.*, 2006).

### 3.5 OCRATOXINA

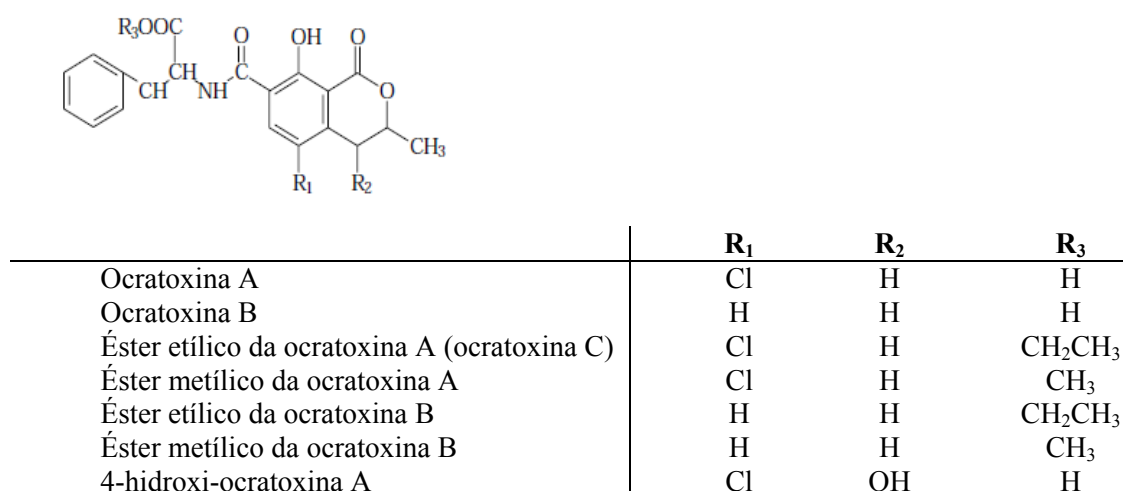
A localização tropical/subtropical do território brasileiro proporciona condição climática excelente ao fungo micotoxigênico (PEDROSA & DEZEN, 1991). O efeito deletério de micotoxina na saúde humana e animal é relatado desde a antiguidade, sendo reconhecido entre agentes capazes de induzirem efeito carcinogênico, hepatotóxico, imunossupressivo, genotóxico, mutagênico, entre outros (FREIRE *et al.*, 2007).

Atualmente, 25% de produtos agrícolas mundiais expõem-se à contaminação por determinada micotoxina, cuja persistência em alimento se deve à estabilidade molecular, resistindo a processos físico-químicos comuns de processamento (FREIRE *et al.*, 2007; JOUANY, 2007; AMEZQUETA *et al.*, 2009). A crescente preocupação de países importadores com relação ao micotoxinas tem conduzido à elaboração de legislação cada vez mais rígida, com a redução de nível máximo permitido (FREIRE *et al.*, 2007).

Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, com destaque a *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *P. verrucosum* (BATTILANI *et al.*, 2006; SARTORI *et al.*, 2006). A OTA é uma dihidroisocumarina ligada à L-fenilalanina na posição 7-carbonila (7-[L-β-fenilalanil carbonil] carboxil-5-cloro-8 hidróxi-3,4 diidro-3R metil isocumarina), sendo o análogo mais

abundante e tóxico (Figura 4). Entre outros análogos citam-se a ocratoxina B (OTB), C (OTC), 4-hidroxi-AO (OH-OTA), éster metil de OTA, OTB e OTC e derivados como dihidroximetil- derivados de ácidos carboxílicos de isocumarina: ocratoxina  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) (BACALONI *et al.*, 2005; MECA *et al.*, 2010).

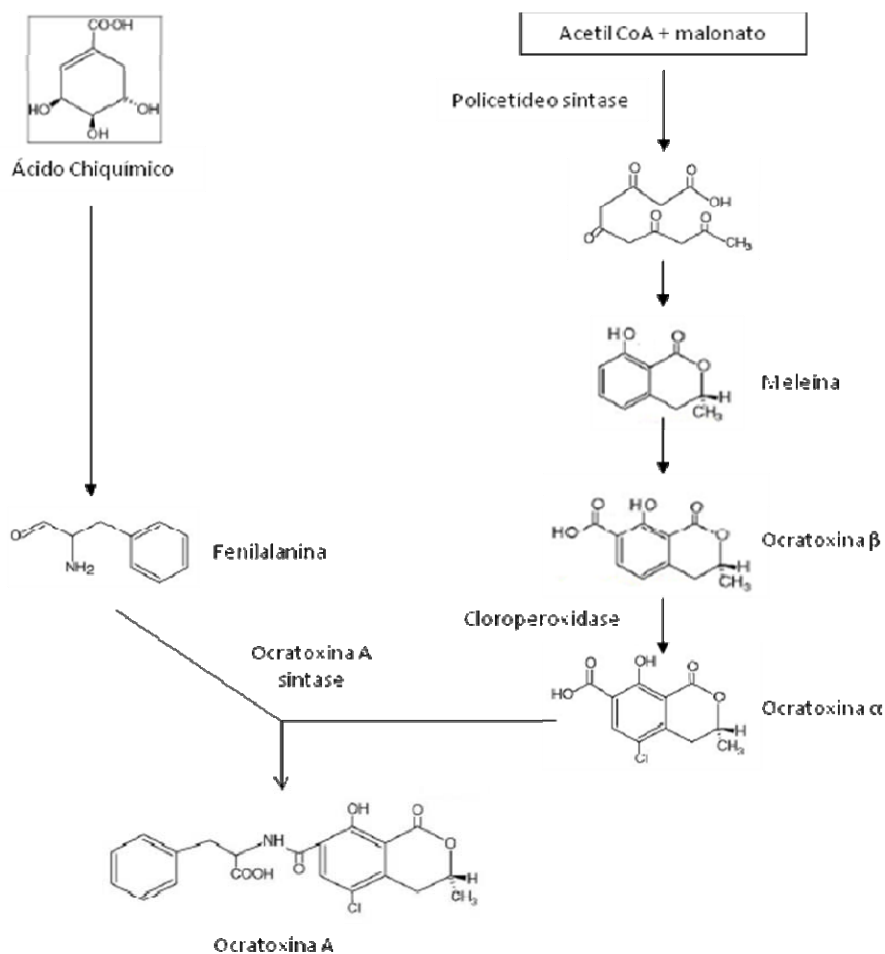
**Figura 4** – Estrutura química de ocratoxinas. Fonte: Furlani; Soares (1999)



Ocratoxina A (MM = 403,8 g mol<sup>-1</sup>) é composto cristalino incolor, caráter ácido, com pK<sub>a</sub> de 4 e 7 para o ácido carboxílico e grupo fenólico, respectivamente (BACALONI *et al.*, 2005; FRENETTE *et al.*, 2008). A molécula caracteriza-se pela polaridade média e alta estabilidade térmica, apresentando grupos cromóforos com fluorescência azul sob luz UV a 335 nm (FUJII *et al.*, 2002).

A biossíntese de OTA não está completamente elucidada, mas os precursores marcados com C<sub>14</sub> e C<sub>13</sub> mostraram a origem da porção fenilalanina pela via do chiquimato e, dihidroisocumarina pela via de policetida (Figura 5). A etapa de policetídeo isocumarina consiste na condensação de uma unidade de acetato (acetil Co-A) com 4 unidades de malonato, seguida de formação de um anel de lactona (síntese de meleina) e adição de grupo carboxila derivado de *pool* C<sub>1</sub>, como S-metilmetionina e formato de sódio (síntese de OT $\beta$ ). O cloro é incorporado pela cloroperoxidase (síntese de OT $\alpha$ ). A ocratoxina A sintetase catalisa a ligação de OT $\alpha$  com fenilalanina (RINGOT *et al.*, 2006).

**Figura 5** – Biossíntese de ocratoxina A.



Fonte: Ringot *et al.* (2006)

OTA é primariamente nefrotóxica, mas outras atividades deletérias incluem mutagenicidade além de hepatotóxica, imunossupressiva, e possivelmente neurotóxica e genotóxica (FRENETTE *et al.*, 2008). A toxina tem sido relacionada à Nefropatia Endêmica dos Balcãs, caracterizada pela redução progressiva de função renal em humano e desenvolvimento de tumor no trato urinário. A correlação foi demonstrada através do consumo de cereais contaminados com OTA e, presença da micotoxina no sangue da população (FURLANI & SORAES, 1999; MATEO *et al.*, 2007; WELKE *et al.*, 2009). *International Agency for Research on Cancer* classifica a OTA no grupo 2B, i.e. carcinogênico a animais e possivelmente carcinógeno ao homem (IARC, 1993).

A similaridade de OTA à estrutura de fenilalanina confere toxicidade pela inibição ou ativação de fenilalanina-tRNA sintetase. Esta enzima tem fenilalanina como substrato na reação de aminoacilação e alongação de peptídeos, portanto a paralização resulta na inibição pós-transcricional de síntese protéica (AL-ANATI & PETZINGER, 2006;

RINGOT *et al.*, 2006). A OTA é absorvida no trato gastrointestinal da maioria das espécies, com absorção no estômago pela propriedade ácida, e no intestino delgado, particularmente no jejuno proximal, sendo distribuída principalmente para os rins pela via sanguínea, mas detectando-se concentrações baixas no fígado, músculo e gordura. Devido à forte ligação com macromoléculas séricas, a meia-vida longa de OTA atinge 35 dias em humano, com uma proporção metabolizada em metabólito menos tóxico (ocratoxina  $\alpha$ ) e outra, excretada inalterada (AL-ANATI & PETZINGER, 2006; CENTRE FOR FOOD SAFETY, 2006).

OTA é contaminante de ampla distribuição, sendo comum em grão de cevada, milho, centeio, trigo, aveia, café, feijão, especiaria, noz, azeitona, uva, figo, além de vinho, cerveja, e produtos de origem animal como rim de porco. Depois dos cereais, o vinho constitui a maior fonte de ingestão diária de OTA, com maior incidência em vinho tinto, seguido de rosé e branco (CABAÑES *et al.*, 2002; ANN., *Comm. Europ.*, 2002; MATEO *et al.*, 2007; MECA *et al.*, 2010).

A Comissão da Comunidade Européia estabeleceu máximo de OTA permitido em 0,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para alimento infantil processado; 2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para vinho (tinto, rosé e branco) e suco de uva; 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para grãos de cereais; 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para uva seca (ANN., *Comm. Europ.*, 2005). A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC de 07/2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA do Ministério da Saúde do Brasil, estabeleceu limite máximo tolerável para aplicação imediata: 2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para alimentos a base de cereais para alimentação infantil, vinho e suco de uva; 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  cereais e frutas secas; 30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para especiarias (ANVISA, 2011).

Embora a contaminação inicial do OTA esteja relacionada a *A. ochraceus* e *P. verrucosum* em cereais, os estudos demonstraram que as espécies produtoras de OTA em uva pertencem à Seção *Nigri*, especificamente ao agregado de *A. niger* e *A. carbonarius*, sendo último, o principal responsável pela produção de OTA (BAVARESCO *et al.*, 2003; BATTILANI *et al.*, 2006; WELKE *et al.*, 2009). OTA é rapidamente produzido, atingindo valores máximos em 5 dias para *A. carbonarius* e 7-13 dias para *A. niger* (BATTILANI *et al.*, 2006). *A. carbonarius* produziu maior nível de OTA a 15 °C do que a 30 °C, em  $A_w$  entre 0,94-0,99 (ESTEBAN *et al.*, 2006).

Diversos fatores influenciam a contaminação de vinho, desde cultivar, incidência de produtores de OTA em uva, excessiva irrigação, chuva prolongada durante maturação de uva, dano na baga por inseto, ave e outros, favorecendo infecção por fungo micotoxigênico, a processos de vinificação (maceração, duração e temperatura de fermentação). Determinados pesquisadores consideram o crescimento de fungos produtores

de OTA no barril, tanque ou em equipamento em fase anterior ao contato com a uva ou vinho (BATTILANI *et al.*, 2006; WELKE *et al.*, 2009; MECA *et al.*, 2010).

### 3.6 METODOLOGIA ANALÍTICA NA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA

Os métodos empregados para a quantificação de ocratoxina são baseados em química analítica representados pela Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE ou HLC-FL), Cromatografia em camada delgada (CCD ou TLC), Cromatografia gasosa (CG), assim como biológicos baseia-se em imunquímica, como *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay* - ELISA (BACALONI *et al.*, 2005; CHO *et al.*, 2005).

A legislação da Comunidade Européia (2006) não especifica método para quantificação de micotoxina em alimento, podendo o Laboratório selecionar o que satisfaça critérios analíticos, conforme abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1** – Critério para determinação de ocratoxina A pela legislação da Comunidade Européia (2006).

Nível (µg/kg)	Ocratoxina A		
	DP <sub>r</sub> *(%)	DP <sub>R</sub> ** (%)	Recuperação (%)
<1	≤40	≤60	50-120
1-10	≤20	≤30	70-110

\*DP<sub>r</sub> = desvio padrão (repetibilidade); \*\*DP<sub>R</sub> = desvio padrão (reprodutibilidade)

Este fato possibilita a inserção de técnicas imunquímicas com relação à analítica reconhecida, com destaque especial a métodos rápidos baseados em anticorpo específico, seja poli ou monoclonal. I.e., o desenvolvimento de imunoferramentas embutindo as mais variadas tecnologias, tendo como base o ensaio imunoenzimático – ELISA e coluna de imunoafinidade, e avançar para inovação tecnológica rápida com ênfase a biosensores.

Tendo em imunoferramenta a base promissora para inovação tecnológica, apresenta-se a seguir breve explanação sobre anticorpo monoclonal, imunensaio ELISA e coluna de imunoafinidade.

### 3.7 METODOLOGIA ANALÍTICA BASEADA EM IMUNOQUÍMICA

A química analítica isenta de solventes tóxicos e equipamentos sofisticados tem sido a meta do desenvolvimento da imunobiotecnologia aplicada ao controle de resíduos, protegendo o analista e evitando a contaminação ambiental. O imunoenensaio é procedimento semi-quantitativo para avaliação de substâncias em baixa concentração, a base do procedimento é reação antígeno-anticorpo, i.e., ligação específica de Ac com a molécula analisada (KOOLMAN & ROEHM, 2005).

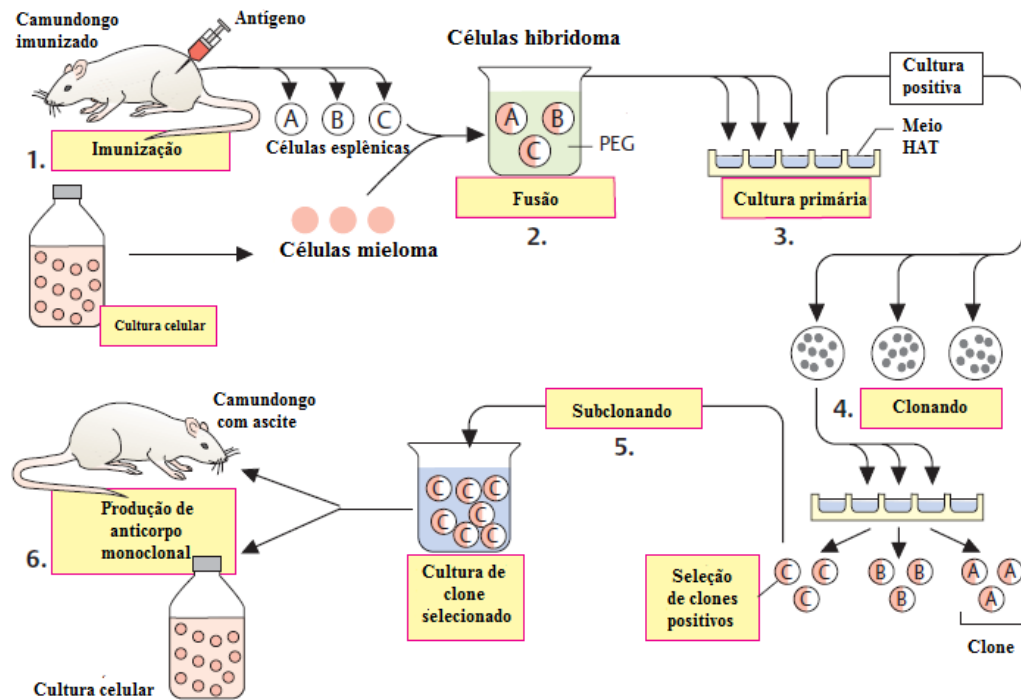
#### 3.7.1 Hibridoma Produtor de Anticorpo

Anteriormente, a imunquímica dependia exclusivamente de anticorpo policlonal, usualmente produzido em animais como coelho e carneiro. A limitação estava na produção comercial que consistia no fornecimento contínuo de antígeno altamente purificado para imunização e variabilidade individual do animal na qualidade de anti-soro. A tecnologia introduzindo produção de anticorpo monoclonal superou o problema, permitindo a implementação *in vitro* empregando o cultivo de célula híbrida, o hibridoma. A produção contínua de anticorpo monoclonal de alta reprodutividade em larga escala revolucionou a imunologia e teve grande impacto em diversas áreas da pesquisa, quanto na prática clínica (HEILMANN *et al.*, 2005; ABBAS *et al.*, 2011; NCBI, 2011).

A tecnologia de hibridoma foi desenvolvida em 1975 por Geroges Kohler e Cesar Milstein. A técnica consiste na imortalização de linfócito B, produtor de Ac específico, fusionando-o com célula de mieloma (ABBAS *et al.*, 2011). Para produção de AcM específico (Figura 6), o camundongo ou rato são imunizados com o Ag de interesse, sendo as células do baço ou linfonodos isoladas para posterior fusão com linha celular imortalizada adequada, i.e., célula de mieloma, gerando híbridos mais estáveis. O meio HAT (hipoxantina aminopterina timidina) seleciona célula hibridoma, i.e. diferencia células fusionadas de não-fusionadas. Aminopterina bloqueia a via principal para síntese de nucleotídeos (via De Novo), uma via alternativa é a Salvage que pode ser utilizada pelo hibridoma, mas não pela de mieloma, uma vez que não tem o gene produtor de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase. Linfócitos B não fusionados com célula de mieloma apresentam tempo de vida curta, 1 ou 2 semanas, sobrevivendo apenas as células híbridas. O hibridoma é clonado em concentração para obter uma célula por poço de microplaca utilizado para o cultivo, procede-se com radioimensaio (RAI) ou ELISA para avaliar produção de AcM.

Confirmado a positividade, a célula hibridoma é subclonada e a produção de AcM pode ser feito *in vitro* ou *in vivo* produzido em fluido ascítico em camundongo (ABBAS *et al.*, 2011; PANDEY, 2010).

**Figura 6** – Tecnologia de Hibridoma para produção ilimitada de anticorpo monoclonal. PEG: polietilenoglicol; Meio HAT (hipoxantina aminopterina timidina)



Fonte: Kooman e Roehm (2005)

O anticorpo é composto por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas (Figura 7-a). Uma cadeia leve (25 kDa) é ligada a uma cadeia pesada (50 kDa) por ligação covalente dissulfeto (S-S), ocorrendo também pontes de dissulfeto entre as cadeias pesadas. As cadeias leve e pesada contêm série de unidades homólogos repetidas, cada um com aproximadamente 110 aminoácidos (aa), dobrando-se independentemente em forma globular formando o domínio da Imunoglobulina (IgG). A cadeia pesada contém 4 domínios ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ ) e a cadeia leve ( $C_L$  e  $V_L$ ) (KOOLMAN & ROEHM, 2005; ABBAS *et al.*, 2011; MAYER, 2009).

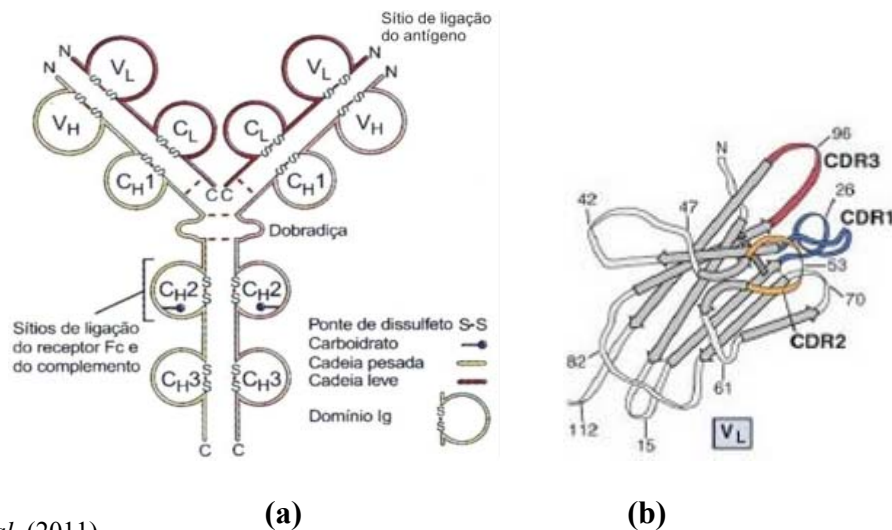
As cadeias leve e pesada possuem região aminoterminal variável, responsável pelo reconhecimento de Ag, e região carboxiterminal referida como região constante, visto que a sequência de aa é bastante conservada em Ac de uma mesma classe de imunoglobulinas. A diferença entre os Acs está em três extensões na regiões V da cadeia leve

e pesada, são os segmentos hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDR- CDR1, CDR2 e CDR3- Figura 7-b). O confinamento da sequência variável as três pequenas extensões permite a estrutura básica do Ac, mesmo com a variabilidade. A ligação do Ag com Ac ocorre nas regiões hipervariáveis  $V_H$  e  $V_L$ , com contato maior com CDR3 (WANG *et al.*, 2006; LENZ, 2004; ABBAS *et al.*, 2011; MAYER, 2009).

Moléculas de Ac apresentam flexibilidade, conferida pela região de dobradiça, localizada entre  $C_{H1}$  e  $C_{H2}$ . O Ac pode direcionar o par de domínios  $V_H$  e  $V_L$  para que duas moléculas de Ag possam ser ligadas ao mesmo tempo em superfície plana (ABBAS *et al.*, 2011).

As estruturas celulares envolvidas na produção, transporte, processamento e secreção do Ac são retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi (CG) e o meio extracelular. As cadeias de polipeptídeos leves e pesados são produzidas no RE e transportadas para o CG para glicosilação, e liberados ao meio extracelular (MCKINNEY *et al.*, 1995).

**Figura 7** – Anticorpo. a) Diagrama esquemático da molécula de anticorpo. b) Regiões determinantes de complementaridade (CDR1, CDR2, CDR3)



Fonte: Abbas *et al.* (2011)

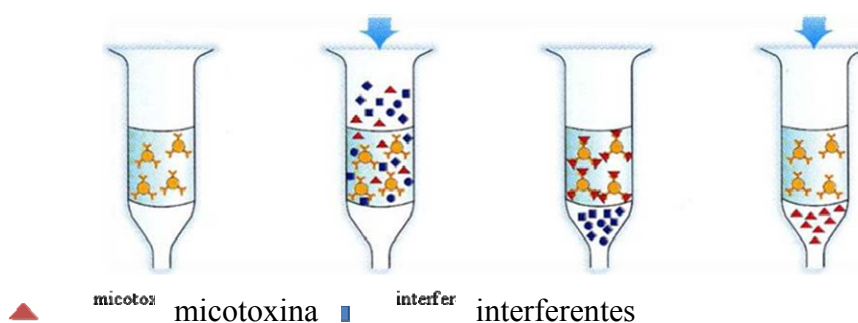
### 3.7.2 Coluna de Imunoafinidade

A Cromatografia de imunoafinidade baseia-se no método com a fase estacionária constituída de anticorpo, ou reagentes relacionados ao anticorpo. A gama de Ac contra uma variedade de moléculas, e a alta seletividade da interação de Ac-Ag colaborou para tornar CIA uma ferramenta popular na purificação-concentração de toxinas biológicas de

baixa massa molecular, anteriormente centrada em métodos químicos. A introdução de componente biológico (Ac immobilizado em mini-coluna) na etapa de limpeza maximizou a subsequente análise qualitativa-quantitativa empregando CLAE, ou outras técnicas analíticas de alta sensibilidade (HAGE, 1998; FUJII *et al.*, 2004).

A coluna de imunoafinidade (CIA), preparada com anticorpo monoclonal ou policlonal anti-micotoxina immobilizado em 0,2-0,5 mL de gel, destacam-se por proporcionar simplicidade, alta especificidade e recuperação, melhorando o limite de detecção e possibilitando análise de uma variedade de compostos em matrizes complexas distintas (Figura 8). Com a vantagem do uso de tampão, não prejudica a interação antígeno-anticorpo, dispensando o emprego de solvente tóxico (VISCONTI *et al.*, 1999; FUJII *et al.*, 2004; SENYUVA & GILBERT, 2010).

**Figura 8** – Procedimento de limpeza e concentração do analito de interesse.



A) Coluna de imunoafinidade com anticorpo immobilizado, B) Passagem de amostra; C) Analito de interesse ligado ao Ac e saída de interferentes e D) Rompimento da ligação Ag-Ac e eluição do analito de interesse.

Fonte: R-Biopharm Rhône Ltda, EUA

Os fatores que reduzem o desempenho de coluna são baixa especificidade ao Ag, concentração insuficiente de Ac na coluna, baixa avidade de Ac, ou desenvolvimento de protocolo com eluição fraca (SENYUVA & GILBERT, 2010). A CIA é utilizada na limpeza e concentração de compostos de interesse na amostra, reduz a interferência da matriz, sendo solução simples e rápida (CHO *et al.*, 2008). As amostras líquidas como leite, vinho, vinagre, cerveja, vinagre e molho de soja podem ser diretamente introduzidas na CIA, sem extração prévia, ou apenas pós-diluição em PBS (SENYUVA & GILBERT, 2010).

Sugita-Konishi *et al.* (2006) utilizaram a CIA na extração de OTA em trigo, fubá de milho e café verde não contaminadas. O teste de recuperação adicionando 0,5 e 5,0 µg/Kg de OTA atingiu nível de recuperação respectiva de 79,6 e 81,5 % em trigo; 79,0 e 85,8 % em milho; 64,6 e 59,0% em café verde, indicando viabilidade na análise de amostras em baixos ou altos níveis de contaminação.

A CIA é comercializada para determinação de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, ocratoxina A, desoxinivalenol, zearalenona, toxina T-2 e HT-2, fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, citrininas, tendo também coluna preparada com mix de anticorpos (SENYUVA; & GILBERT, 2010). Colunas de imunoafinidade disponíveis comercialmente para análise de OTA são Ochratest (Vicam®, EUA); Ochrapep e Ochrascan Easi-Extract ochratoxin (Röhne Diagnostics Technologies®, Reino Unido), RIDA ochratoxin (R-Biopharm®, Alemanha) e OchraStar™ (Romer Labs Diagnostic GmbH, Austria) (FUJII *et al.*, 2004; FABIANI, 2010).

O material suporte e técnica de imobilização de Ac são fundamentais para o desenvolvimento da CIA. A maioria de CIAs são confeccionadas com materiais suportes a base de carboidrato (agarose ou celulose), ou orgânico sintético (polímero de acrilamida, copolímero ou derivados, derivados de polimetacrilato e matrizes polietersulfona). Esses suportes são relativamente simples e de baixo custo, mas a principal desvantagem é a baixa propriedade de transferência de massa, e estabilidade limitada às altas pressões, limitando a aplicação direta dessa coluna em *High Performance Immunoaffinity Chromatography* (HPIAC). O suporte de imunoafinidade empregado em HPIAC necessita ser rígido e ter maior eficiência em relação ao suporte de baixa performance, a exemplo, da sílica derivatizada, do vidro e do metacrilato polimérico (HAGE, 1998; MOSER & HAGE, 2010).

Entre técnicas de imobilização randômica de Ac em suporte, destaca-se a reação de grupamento amino livre do Ac com suporte ativado com *N,N'-carbonyl diimidazole*, *cyanogen bromide*, N-hidroxisuccinamida e *tresyl chloride/tosyl chloride* (HAGE, 1998).

O suporte Affi-gel 10, é exemplo de imobilização randômica, promovendo ligação com a molécula de Ac via amina primária, sendo que depois da adição de Ac ocorre deslocamento da porção N-hidroxisuccinimida e uma ligação amida estável é formada. Apesar da formação de ligação randômica, o imunossuporte apresenta cadeia de 10 carbonos, possibilitando liberdade conformacional do Ac para que tenha acesso ao Ag (VANKOVÁ *et al.*, 1988).

Em adição, a imobilização de Ac pode ser feita por resíduo de carboidrato localizado na região Fc. O processo é realizado primeiro com a oxidação de resíduo de carboidrato para gerar resíduo de aldeído, posteriormente reagido com suporte contendo hidrazida ou amina. Outra abordagem para imobilização é a ligação de proteína A e G de parede celular de bactéria com região Fc do Ac, as proteínas são utilizadas como suporte quando alta atividade de Ac é necessária, sendo necessária quantidade alta de Ac para manter a reprodutibilidade da coluna por longo tempo (MOSER & HAGE, 2010).

A desvantagem referente ao alto custo de CIA comercial tende a ser minimizada aplicando processo de regeneração da coluna, capaz de permitir reutilização sem perda significativa na atividade (FUJII *et al.*, 2004). Kondo *et al.* (2002) desenvolveram coluna com AcM anti-microcistina LR em suporte Formyl-Cellulofine® e reutilizou por 4 vezes. O reuso da CIA foi avaliada pela recuperação de amostras de água de lago contaminadas com microcistina RR, YR e LR (100 ng cada). A recuperação de microcistina no primeiro uso foi de 87-88 %, segundo e terceiro de 83-88 %, e no quarto e quinto uso de 63-77 %. O resultado indica que a CIA desse estudo pode ser usado por até três vezes.

Silva (2010) confeccionou CIA com 5 mg de AcM anti-OTA em suporte Affi-gel 10. A regeneração possibilitou três reusos para concentrações de 0,5; 2 e 5 ng/mL de OTA, enquanto as mesmas concentrações avaliadas em CIA comercial permitiu reuso de três; um e dois, respectivamente.

Alguns pesquisadores obtiveram maior êxito no número de reuso de CIA. Quiao *et al.* (2009) prepararam CIA em suporte CNBr-*activated* Sepharose 4B e anticorpo policlonal contra levonorgestrel, fármaco contraceptivo, com reuso superior a 35 vezes sem perda na performance de CIA. Watanabe *et al.* (2001) desenvolveram CIA em suporte CNBr-*activated* Sepharose 4B e AcM contra fungicida imazalil em amostras de frutas cítricas e, permitiu reuso de pelo menos 30 vezes.

### 3.7.3 Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) para Determinação de Ocratoxina A

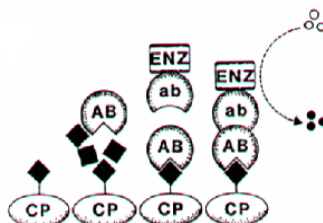
O ensaio imunoquímico, ELISA (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*) é uma alternativa promissora na detecção rápida de OTA em alimento. A alta sensibilidade (nível de ng/mL), simplicidade, confiabilidade, baixo custo, não necessitando de treinamento de técnico, limpeza extensiva de amostra, possibilitando análise simultânea de grande número de amostras, permite rápida triagem (BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996; ONO *et al.*, 2000; MEIRELLES *et al.*, 2006; FUJII *et al.*, 2007).

ELISA para detecção de micotoxinas tem sido desenvolvida utilizando anticorpo policlonal (AcP) e monoclonal (AcM) (BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996). O AcM caracteriza-se pela uniformidade, alta especificidade, baixa reatividade cruzada, características essenciais para o desenvolvimento de imunoenaios sensíveis para a micotoxicologia, já que a técnica ELISA baseia-se no princípio da alta especificidade da reação imunológica entre antígeno e anticorpo (BRUCE *et al.*, 2002; FUJII *et al.*, 2002; FLAJS *et al.*, 2009).

A baixa massa molecular das micotoxinas confere baixa imunogenicidade, portanto a modalidade de ELISA para a determinação de OTA seria o competitivo indireto (ic-ELISA), já que requer apenas um anticorpo específico. A alta especificidade é fundamental para evitar reação falso-positiva, sendo a reatividade do ic-ELISA dependente exclusivamente de anticorpo primário (FUJII *et al.*, 2004).

O princípio de ic-ELISA (Figura 9) baseia-se na competição entre a toxina presente na amostra e aquela adsorvida à microplaca (OTA-BSA; OTA-*Bovine Serum Albumin*), pelo sítio de ligação específico do anticorpo monoclonal. Nesta modalidade, a adsorção do anticorpo à superfície sensibilizada ocorre em proporção inversa à quantidade do analito presente, i.e, a concentração de toxina na amostra é dada indiretamente pela quantificação do anticorpo específico adsorvido, que atua como sítio de ligação ao anti-IgG (anticorpo secundário) marcado com a enzima responsável pela reação colorimétrica (FUJII *et al.*, 2002).

**Figura 9** – Esquema de ELISA competitivo indireto.



CP: proteína carreadora conjugada com a micotoxina; AB: anticorpo primário específico à micotoxina; ab: anticorpo anti-IgG com a enzima; ◆ antígeno; ○○ substrato cromógeno.

Fonte: Pestka *et al.* (1995)

Em contraste ao preparo de antígeno para imunização, o acoplamento de OTA à microplaca procede-se com peptídeo aderente, visando obtenção de conjugado estável e economicamente viável. Conjugados de OTA-BSA, KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*) e OVA (ovalbumina) podem ser utilizados em ELISA. KLH consiste na melhor carreadora de OTA, mas de custo alto; a OTA-OVA apresenta menor estabilidade em relação ao reagente preparado com BSA, além do descongelamento causar perda da atividade (KAWAMURA *et al.*, 1989).

A correlação adequada entre ic-ELISA e CLAE na detecção de OTA foi obtido por Flajs *et al.* (2009) com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,821 e Fabiani *et al.* (2010) com  $r = 0,8994$  em vinho tinto; Fujii *et al.* (2007) com  $r = 0,98$  em café verde e torrado. Em outras áreas da ciência, esta correlação também se apresenta promissora, como

Baranowska *et al.* (2008) obtiveram  $r=0,97$  para determinação de pesticida atrazina em solo, água e planta, e Marcobal *et al.* (2005),  $r= 0,91$  para determinação de histamina em vinho tinto.

A desvantagem de análise por ELISA limita-se a restringir aplicação da análise a determinados tipos alimentares, devido ao efeito de matriz interferindo na reação imunológica. I.e., interação inespecífica de anticorpo com proteína e ácido graxo, ou bloqueio estérico da ligação do Ac e analito superestimando a concentração da micotoxina, e consequente reação falso-positiva. Esta inespecificidade pode ser minimizada diluindo o extrato bruto, ou adotando processo simples de limpeza da amostra (ONO *et al.*, 2000; FUJII *et al.*, 2004).

### 3.8 AVANÇOS NA IMUNOTÉCNICA: BIOSENSOR E ESTABILIZAÇÃO DE SÍTIO ATIVO PARA AUTOMAÇÃO

Alternativamente ao ELISA, métodos rápidos para detecção de micotoxina incluem imunoenensaio baseado em membrana (*flow-through assay*, *lateral flow test*), ensaio fluorimétrico, polarização fluorescente. Outros métodos para detecção de micotoxina têm sido propostos, como biosensor de ressonância plásmica de superfície, *Molecularly Imprinted Polymers* (MIP), imunossensor de fibra óptica, tecnologia do *Microarray* e *Luminex's x MAP* (ZHENG *et al.*, 2006).

A introdução de tecnologia *screenprinted* permite o uso de biosensor *in situ* ou para teste descentralizado, sendo altamente desejável, bem como a viabilidade de miniaturizar (ALONSO-LOMILLO *et al.*, 2010). O biosensor é constituído de elemento biológico, transdutor e de parte eletrônica, podendo ser empregado na superfície sensora microrganismo ou material oriundo de organismo como anticorpo, ácido nucléico, célula, organela, proteína, entre outros. A interação de uma ou mais propriedades físico-químicas são detectadas e medidas pelo transdutor. O principal objetivo é produzir sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência a concentração de um determinado analito ou grupo de analito que interagem com o elemento biosensível (FURTADO *et al.*, 2008). Existem diferentes transdutores utilizados em biosensor, como o eletroquímico (movimento de íons, difusão de espécies eletroativas), óptico (mudança de temperatura), pizeletrico (alteração de massa e/ou microviscosidade) e termométrico (absorção ou emissão de radiação eletromagnética) (FURTADO *et al.*, 2008; CONROY *et al.*, 2009).

Pietro-Simón *et al.* (2008) testaram duas estratégias ic-ELISA para o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de OTA baseado em diferentes procedimentos de imobilização de OTA; considerando o baixo limite de detecção para imunossensor com anticorpo secundário marcado com *horseradish peroxidase* (LD= 0,7 ng/mL) e fosfato alcalina (LD= 0,3 ng/mL) validam o imunossensor como ferramenta para detecção de OTA em vinho. Alonso-Lomillo *et al.* (2010) imobilizaram *horseradish peroxidase* em matriz de polipirrol sobre eletrodos de carbono *screen-printed* descartáveis para detecção de OTA. A viabilidade do biosensor desenvolvido na determinação de cerveja e café torrado contaminado artificialmente com OTA obteve recuperação média de 103% e 99%, respectivamente.

Os polímeros sintéticos com impressão molecular – MIP, aparecem nesta última década como uma ferramenta promissora no desenvolvimento de sistema com reconhecimento biomimético (semelhante ao sistema antígeno-anticorpo). A impressão molecular é induzida pelo sítio de reconhecimento específico no material modelo constituído de polímero. Aplicação potencial de MIP em análise de micotoxina são extração em fase sólida, dispositivo de biosensor e matriz cromatográfica de separação. Apresentam vantagens em relação aos anticorpos compreendem o baixo custo, facilidade de preparo, uso de solvente orgânico, estáveis em qualquer faixa de pH, temperatura e pressão, e possibilidade de síntese de biomolécula não disponível ou quando possui alto custo. Mas apresentam algumas limitações, como o custo do modelo pode variar consideravelmente entre compostos, a estrutura estereoquímica exata para impressão não é conhecida e uso de solvente com composição alterada pode alterar a cavidade de impressão, resultando em perda de seletividade (ZHENG *et al.*, 2006).

### 3.9 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais (ACP) é uma análise multivariada, que possibilita investigações com grande número de dados disponíveis; identificação de medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações; transformando o conjunto original de variáveis em outro conjunto, as componentes principais (CP) de dimensões equivalentes (JOHNSON & WICHERN, 1998; VICINI, 2005).

Na ACP o grupo de dados é representado por matriz (Figura 10-a), sendo linhas correspondentes às variáveis e colunas aos objetos (amostra). Em representação

bidimensional da matriz encontra-se o número de pontos equivalente ao número de colunas da matriz (Figura 10-b). Quando a matriz é constituída por variáveis de unidades distintas, estas podem ser reduzidas a uma medida comum por meio do processo de normalização, consistindo na divisão de cada amostra da matriz pela variância da coluna a qual esta amostra pertença. A variável normalizada é adimensional, apresentando média zero e variância igual a 1 (YABE, 1995).

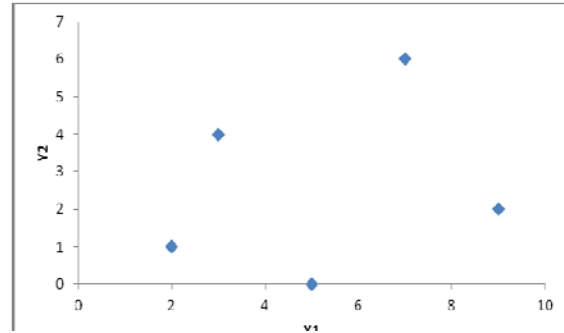
A redução de número de variáveis é feita por cálculo de autovetor e autovalor, medindo a quantidade de variância explicada em cada uma delas. A direção do primeiro autovetor (CP1) descreve a quantidade máxima de variação dos dados da matriz. Quando o total de variância não pode ser considerado utilizando apenas um autovetor, um segundo eixo (segundo autovetor-CP2), ortogonal ao primeiro, descreve a quantidade máxima de variação residual no grupo de dados, sendo cada CP sucessivo descreve menor fração de informação (Figura 10-c). Os autovetores permanecem no mesmo espaço de variável original, sendo vistos como rotação de eixo original e usados como novo grupo de eixo para matriz, determinando a rotação que melhor descreve a informação da matriz usando número mínimo de dimensões (YABE, 1995).

A Análise de Agrupamentos (AA) encaixa-se em metodologia numérica multivariada, propondo uma estrutura classificatória, ou de reconhecimento da existência de grupos para obter um número de grupos homogêneos, segundo algum critério de homogeneidade. A AA é um método simples, fundamentada no cálculo de distância (VICINI, 2005).

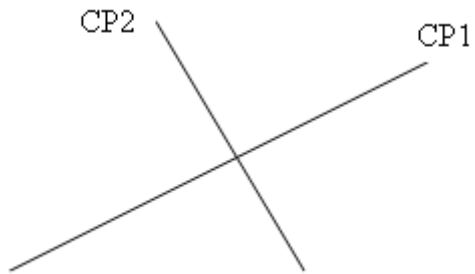
**Figura 10** – Análise de componentes principais

$$Y = \begin{bmatrix} 2 & 3 & 5 & 7 & 9 \\ 1 & 4 & 0 & 6 & 2 \end{bmatrix}$$

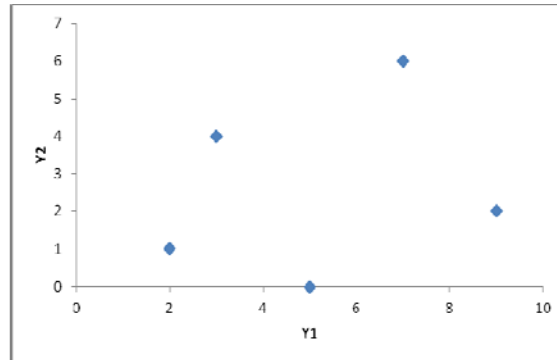
(a) Matriz de dados (ordem 2x5)



(b) Representação bidimensional de 5 objetos (colunas)



(c) Componentes principais 1 (CP1) e 2 (CP2) explicando a maior variância de dados



Fonte: Yabe (1995)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Infra-Estrutura

O trabalho foi conduzido no Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Centro de Ciências Agrárias), Depto. de Bioquímica e Biotecnologia e Depto. de Química (Centro de Ciências Exatas) da Universidade Estadual de Londrina.

#### 4.1.2 Vinho Tinto

Um total 60 amostras de vinho tinto de diferentes procedências, pertencentes à safra 2009 e 2010, foram coletadas e armazenadas -12 °C até o momento de análise para contaminação por OTA, assim como capacidade antioxidante, *trans*-resveratrol e parâmetros cromáticos. As 26 amostras argentinas foram coletadas em Buenos Aires-Argentina, enquanto que 34 amostras de vinho da variedade Bordô, proveniente da região Sudoeste e Oeste do Paraná, foram coletadas por extensionistas do Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER).

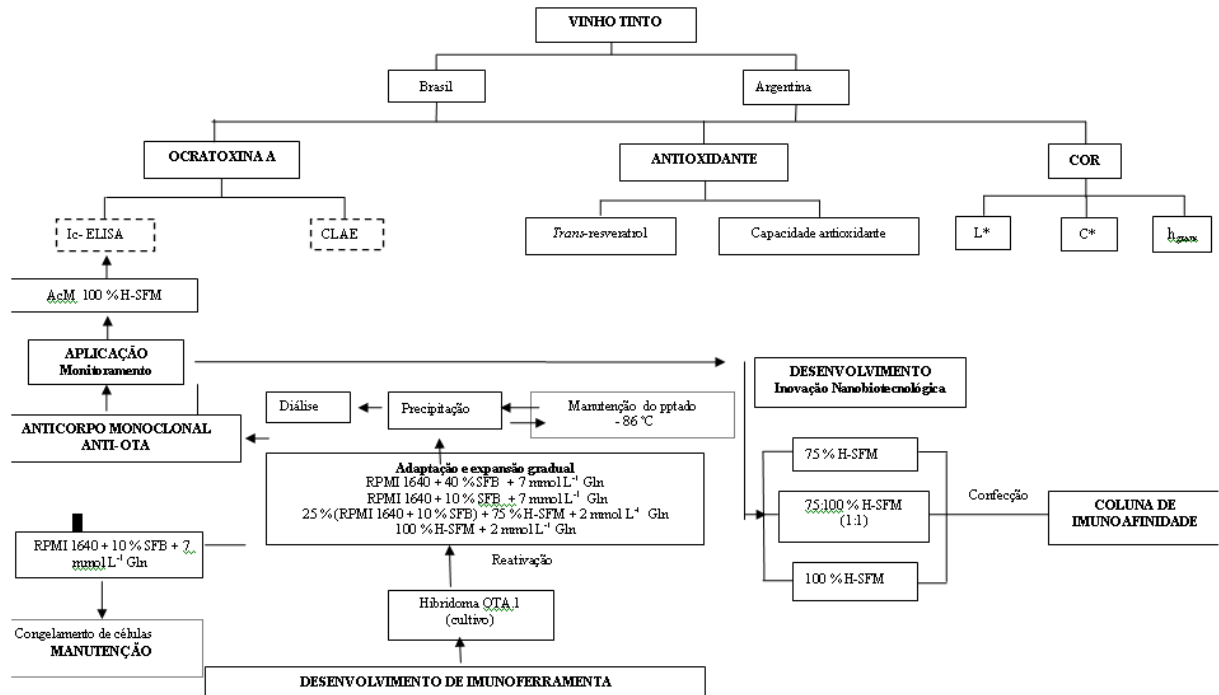
#### 4.1.3 Hibridoma Linhagem OTA.1

O hibridoma produzido pelo Dr. Osamu Kawamura de *Kagawa University*, Japão foi cedido e transportado até o Brasil, reativadas e armazenadas em N<sub>2</sub> a -185 °C.

### 4.2 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

A Figura 11 apresenta o fluxograma referente ao procedimento experimental de análise (estudo comparativo da contaminação de OTA por ic-ELISA e CLAE), qualidade funcional e parâmetro cromático de vinho nacional e argentino, assim como o cultivo de hibridoma produtor de AcM anti-OTA para o desenvolvimento de imunotécnica a ser empregada no monitoramento de baixo custo na rotina de controle de qualidade nacional. O detalhe de cada procedimento técnico consta no item Resultados e Discussão, apresentado na forma de capítulo.

Figura 11 – Fluxograma do projeto.



L\*: luminosidade; C\*: croma; h<sub>graus</sub>: tonalidade cromática

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos em forma de capítulo, para posterior publicação:

Hibridoma OTA.1 utilizado na produção de anticorpo monoclonal anti-OTA para desenvolvimento de CIA Affi-gel 10 para monitoramento de ocratoxina A

Qualidade (capacidade antioxidante, *trans*-resveratrol, cor) e segurança (ocratoxina A) em vinho tinto da Argentina e do Paraná, Brasil

### 5.1 HIBRIDOMA OTA.1 UTILIZADO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-OTA

#### PARA DESENVOLVIMENTO DE CIA AFFI-GEL 10 PARA MONITORAMENTO DE OCRATOXINA A

**Resumo:** Hibridoma OTA.1, secretor de anticorpo monoclonal anti-ocratoxina (AcM anti-OTA), foi cultivado para obter AcM imobilizado em suporte sólido visando confeccionar a coluna de imunoafinidade (CIA) destinado ao isolamento/concentração de OTA em matrizes alimentares complexas. O cultivo de Hibridoma OTA.1 foi iniciado em meio RPMI 1640 suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) e L-glutamina, a 37 °C sob 5% CO<sub>2</sub>. Gradualmente a concentração de meio foi reduzido a 10 % SFB e substituído gradualmente por 15, 30, 50, 75, 80 e 100% de meio H-SFM Hibridoma-*Serum Free Medium* (H-SFM). O enriquecimento com 7 mmol L<sup>-1</sup> de L-glutamina e cuidado especial em etapa inicial de cultivo, propiciou adaptação e expansão celular. Assim, no primeiro cultivo, obteve-se 3000 mL do sobrenadante contendo 618,00 mg de proteína (206,2 µg/mL), seguida de segundo cultivo com 6500 mL de sobrenadante (33,38 µg/mL), sendo o AcM precipitado com sulfato de amônio a 60% de saturação e mantido a -86 °C até o uso. Seis CIAs experimentais foram confeccionadas imobilizando 5 mg de AcM 100 % H-SFM (CIA 1 e 2); 75:100 % H-SFM (1:1; CIA 3,4 e 5) e 75% H-SFM (CIA 6) em um mL de suporte Affi-gel 10. O procedimento consistiu em etapa de acoplamento, bloqueio com etanolamina-HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) e lavagem com tampão fosfato salino (PBS) 0,015 mol L<sup>-1</sup> pH 7,3 com modificações para o desenvolvimento. A taxa de imobilização variou de 77,43±6,39 a 97,55±0,24 %, acoplando 3,88±0,32 a 4,88±0,01 mg de Ac por mL de gel, respectivamente. A menor taxa de imobilização ocorreu com AcM 100 % de H-SFM dialisado com PBS/água ultra-pura (acoplamento a 25 °C/2 h), indicando provável desnaturação de AcM. A CIA 6 desenvolvida com AcM 75 % de H-SFM dialisado em PBS 0,015M, com acoplamento a 4 °C/24 h, apresentou alta atividade anti-OTA por i-ELISA, sugerindo que proteínas inerentes do próprio cultivo favoreceu a imobilização de AcM. O desenvolvimento de CIA visa fornecer ferramenta adequada para monitoramento de OTA no controle de qualidade de alimento, assegurando qualidade de produto da agricultura brasileira no mundo globalizado. Os estudos devem prosseguir avaliando a aplicação de CIA desenvolvida com AcM produzido no cultivo de 75 % H-SFM perante diferentes matrizes alimentares

**Palavras-chaves:** Hibridoma. Anticorpo monoclonal. Ocratoxina. Coluna de imunoafinidade Hybridoma OTA.1 used to production anti-OTA monoclonal antibody to development IAC Affi-gel 10 for ochratoxin A monitoring

**Abstract:** Hybridoma OTA.1, secreting monoclonal antibody anti-ochratoxin A (mAbs anti-OTA), was grown for obtained mAb to immobilized on solid support to confection immunoaffinity column (IAC), isolating/concentrating OTA in complex food matrices. Hybridoma OTA.1 cultivation was started in RPMI 1640 medium supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS) and L-glutamine at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>. Gradually the medium concentration was reduced to 10% FBS and gradually replaced by 15, 30, 50, 75, 80 and 100 % of Hybridoma-Serum Free Medium (H-SFM). The enrichment with 7 mmol L<sup>-1</sup> L-glutmine and special care in the cultivation initial stage promoted adaptation and cell expansion. Thus, for the first cultivation, we obtained 3000 mL of culture supernatant containing 618.00 mg of protein (206.2 µg/mL); in the second, 6500 mL of supernatant (33.38 µg/mL), and mAb precipitated with ammonium sulfate at 60 % saturation and kept in - 86 °C until use. Six experimental IACs were confectioned by performing the assay immobilized 5 mg of mAb 100 % H-SFM (IAC 1 and 2); mix of 75:100 % H-SFM (1:1; IAC 3, 4 and 5) and 75 % H-SFM (IAC 6). Such mAbs were immobilized in one mL of Affi-gel 10, which was used as support. The procedure consisted in coupling step, blocking with 1.0 mol L<sup>-1</sup> ethanolamine-HCl (pH 8.0) and washing with 0.015 mol L<sup>-1</sup> Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.3, with some modifications for development. The rate of immobilization ranged from 77.43 ± 6.39 to 97.55± 0.24 %, i.e., 3.88 ± 0.32 to 4.88 ± 0.01 mg of Ac per mL of gel, respectively. The IAC with the lowest immobilization rate corresponds to mAb 100 % H-SFM was dialyzed in ultrapure water (coupling step at 25 °C/2 h), indicating probable denaturing mAb. The IAC 6 prepared with mAb 75 % H-SFM dialyzed in 0.015 M PBS, with coupling step performed at 4 °C/24 h, showed higher performance concerning anti -OTA activity evaluated by indirect ELISA, suggesting that proteins involved on own cultivation probably favored the mAb immobilization. The developed IAC is to provide suitable tool destined for tracking OTA in food quality control, assuring the safety of Brazilian agricultural products in globalized world. The studies should continue evaluating the IAC MAb 75 % H-SFM application in different food matrices.

**Key words:** Hybridoma. Monoclonal antibody. Ochratoxin. Immunoaffinity column.

### 5.1.1 Introdução

A ocratoxina A (OTA), metabólito secundário primariamente nefrotóxica de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., também apresenta atividade mutagênica, genotóxica, hepatotóxica, imunossupressiva e possivelmente neurotóxica, sendo classificado como grupo 2B - carcinogênico a animais e possível carcinógeno ao homem (*International Agency for Research on Cancer - IARC, 1993*).

Contaminante comum em grãos de cevada, milho, centeio, trigo, aveia, café, feijão, especiaria, noz, azeitona, uva, figo, a OTA também contamina vinho e cerveja (*ANN., Comm. Europ., 2002; MATEO et al., 2007; MECA et al., 2010*). A Resolução da Diretoria

Colegiada - RDC de 07/2011 estabeleceu limites máximos toleráveis em alimento para aplicação imediata:  $2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , alimentos a base de cereais para alimentação infantil, vinho e suco de uva;  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , cereais e frutas secas;  $30 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , especiarias (Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, Ministério de Saúde-Brasil, 2011).

A intensa globalização, aliada ao exigente mercado consumidor exige monitoramento contínuo e eficaz, visando minimizar a exposição humana a micotoxinas. O desenvolvimento de métodos validados, cada vez mais sensíveis, requer avanço centrado não somente na metodologia analítica química baseada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), mas também em métodos físicos não destrutivos, em paralelo aos métodos biológicos com ênfase na imun química (PIETRO-SIMÓN *et al.*, 2007).

A tecnologia imun química consiste em alternativa nanobiotecnológica inovadora com avanço acelerado, visando desenvolver biosensor automatizado para diagnóstico rápido com custo reduzido (PIETRO-SIMÓN *et al.*, 2007). A tecnologia fundamenta-se em princípio de ensaio imunoenzimático *Enzyme linked immunoassay* – ELISA e coluna de imunoafinidade – CIA empregados nos atuais *kits* clássicos. A vantagem da bioferramenta consiste em dispensar uso de solvente tóxico, protegendo o analista e evitando a contaminação ambiental (VISCONTI *et al.*, 1999; FUJII *et al.*, 2004; SENYUVA & GILBERT, 2010).

A baixa massa molecular incapacita a OTA em estimular o sistema imunológico, devendo-se empregar uma proteína carreadora na conjugação para estimular a produção de linfócito B – LB produtores de Ac anti-OTA (FUJII *et al.*, 2004). A tecnologia de hibridoma consiste na fusão de LB com célula de mieloma e permite produção ilimitada de anticorpo monoclonal – AcM, caracterizada pela uniformidade e alta especificidade (BRUCE *et al.*, 2002; FUJII *et al.*, 2002; FLAJS *et al.*, 2009). Novas bioferramentas têm sido desenvolvidas com ênfase em diferentes modalidades de biosensor, baseadas em compósitos imun reativos capazes de interação específica com um ou mais analitos na interface bioeletrônica, gerando sinal detectado por meio de eletroquímica, piezoelétrico ou óptico (LUONG *et al.*, 2008). Para superar a susceptibilidade da alta especificidade de reação imunológica que leva a denaturação, os avanços na estabilização de sítio ativo propõem polímeros sintéticos com impressão molecular - MIP (*Molecularly Imprinted Polymers*) como ferramenta promissora no desenvolvimento de sistema com reconhecimento biomimético (ZHENG *et al.*, 2006).

Considerando a dificuldade nacional em deter a base de nanobiotecnologia no fornecimento de nanocompósito biológico de alta especificidade, a pesquisa visa

sedimentar o alicerce fundamental no avanço de desenvolvimento de bioferramenta. I.e., estabelecer a produção de AcM através do cultivo de hibridoma OTA.1 secretora de AcM anti-OTA, e prosseguir na otimização da confecção de CIA com o AcM produzido em proporções diferentes de meio sintético H-SFM, visando reduzir interferentes na fase de purificação por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Pretende-se contribuir com desenvolvimento de CIA nacional capaz de isolar, purificar e concentrar analitos de baixa massa molecular em matrizes complexas, no preparo de amostras para determinação por CLAE, ou outras técnicas de alta sensibilidade.

### 5.1.2 Material e Métodos

#### 5.1.2.1 Material, meio de cultura, reagente e equipamento

Material: microplaca de 24 poços (TPP, Suíça); microplaca de 96 poços (Corning, EUA); 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup> (Nunc, Dinamarca); colunas de polipropileno (Muromac Columns, Japão), membrana em estér de celulose (0,22 µm, 25 mm diâmetro, Merck Millipore, EUA); membrana de celulose para diálise (*cut-off* de 12000-16000 MM, tamanho 25 mm x 16 mm, Sigma-Aldrich, EUA).

Meio de cultura: meio RPMI 1640; meio *Hybridoma-Serum Free Medium* (Gibco Co., EUA).

Reagente: garamicina 80 mg (Schering-Plough, EUA); dimetilsulfóxido (Synth, Brasil); Sulfato de amônio (Nuclear, Brasil); Affi-gel 10 (Bio-Rad, EUA); soro fetal bovino; estreptomicina/penicilina; L-glutamina (Gibco Co., EUA); anti-IgG ligado a HRP (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA); 3, 3',5, 5'tetrametilbenzidina (Sigma, EUA); Coomassie Brilliant Blue R (Sigma, St. Louis, Mo, EUA); marcador molecular (BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, EUA); reativo de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); soro albumina bovina (BSA, Initial fractionation by cold alcohol precipitation ≥ 97 % albumin, Sigma, USA); Azul de Trypan (Acros Organics, EUA).

Equipamento: incubadora sob 5% CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA); centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, 3805 03551, Alemanha); Freezer – 86 °C (CFC free, Sanyo, EUA); recipiente de Nitrogênio (Cryo Diffusion, França); Homogeneizador de sangue para hematologia (BHS\_300, Benfer, Brasil); leitora de ELISA (Asys Expert Plus, Biochrom, EUA); *Bio Freezing Vessel* (Bicell, Nihon Freezer Co. Japão); microscópio de luz

invertida (Lamba LGD2, ATTO Instruments Co., Hong Kong, China); água ultra-pura (Purelab Option-Q, Elga, Reino Unido); fluxo laminar (Clean Plus CL FV-09, Veco, Brasil).

#### 5.1.2.2 Hibridoma linhagem OTA.1

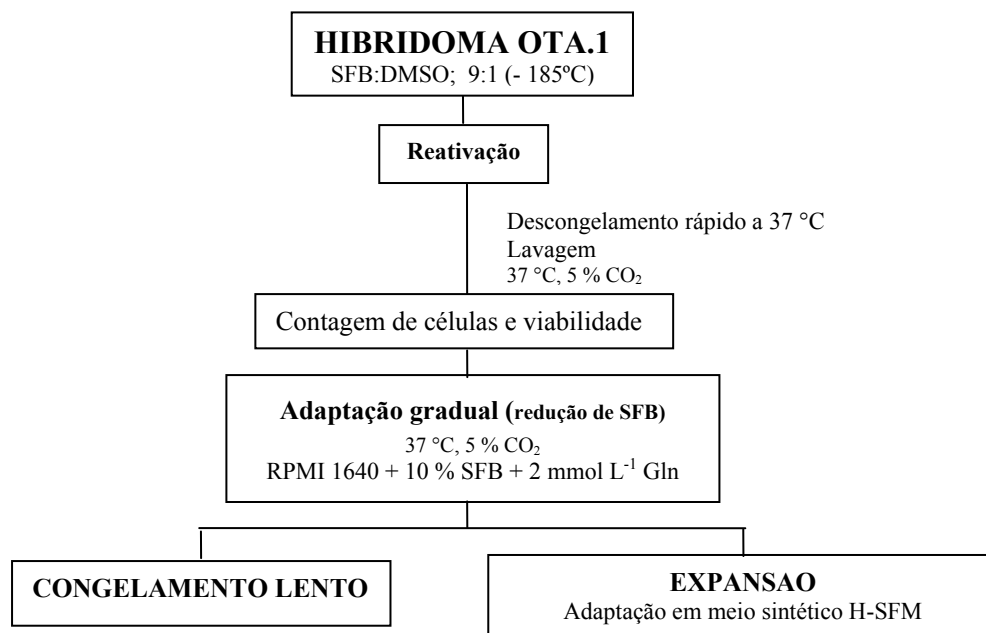
O hibridoma utilizado foi linhagem OTA.1 secretora de anticorpo monoclonal (AcM - isotipo IgG<sub>1</sub> kappa) contra OTA, sendo derivado de mieloma linhagem Sp2/0-Ag14 e célula esplênica de camundongo BALB/c (Kawamura *et al.*, 1989). O AcM anti-OTA produzido apresenta atividade cruzada com OTC (63.1%), OTB (0.63%), OT $\alpha$  (0.06%) e 4-hidroxi-OTA (1.19%).

#### 5.1.2.3 Cultivo de hibridoma OTA.1 produtor de AcM anti- OTA

##### 5.1.2.3.1 Reativação e adaptação gradual no meio RPMI 1640 (redução de SFB)

O hibridoma armazenado em soro fetal bovino e dimetilsulfóxido (9:1, SFB:DMSO, nitrogênio líquido a -185 °C) foi recuperado por descongelamento rápido em banho-maria a 37° C, lavado com 9 mL de meio RPMI 1640 com 1 mL de SFB (1400 xg, 37° C, 3 min) (Figura 12). Após descarte de sobrenadante, as células foram analisadas e contadas, e a viabilidade celular pós-congelamento calculada e expressa em porcentagem, conforme item 2.7 (HARLOW & LANE,1988). A seguir, as células foram cultivadas em meio RPMI + SFB com 2g de bicarbonato de sódio, 2,3g de HEPES e 1 mL de garamicina 80 mg. A porcentagem de SFB foi gradualmente reduzida até 10%, procedendo-se cultivo estático a 37° C sob 5 % CO<sub>2</sub>. O congelamento lento de células hibridoma está detalhado no item 2.4.

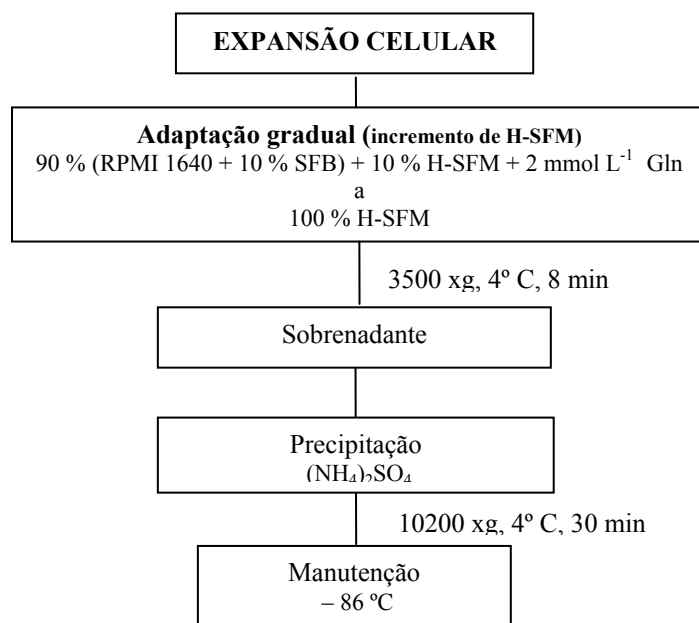
**Figura 12** – Reativação de Hibridoma OTA.1 e adaptação gradual em meio RPMI 1640 com redução de SFB



#### 5.1.2.3.2 Expansão celular: produção de AcM IgG no meio sintético H-SFM

A expansão, visando obtenção de AcM IgG com menor teor de proteínas interferentes, foi realizado procedendo adaptação gradual do hibridoma OTA.1 cultivado em RPMI + 10 % SFB ao meio H-SFM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol L<sup>-1</sup> de glutamina (BRUCE *et al.*, 2002; Kawamura, informação pessoal). Assim, o meio RPMI + 10% de SFB foi gradualmente substituído com o meio sintético H-SFM, até atingir substituição total (Figura 13). O cultivo foi centrifugado (3500 xg, 8 min, 4 °C), seguido de adição de azida sódica 0,02 % no sobrenadante e avaliação perante concentração protéica por método de Bradford e atividade anti-OTA por i-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1989). O sobrenadante obtido foi precipitado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 60% de saturação, centrifugado (10200 xg, 30 min, 4° C) e mantido a -86° C até o uso.

**Figura 13** –Expansão de Hibridoma OTA.1 para produção de AcM em meio sintético H-SFM.



#### 5.1.2.4 Congelamento lento para preservação de hibroma anti-OTA

Cultivo de hibridoma OTA.1 com alta viabilidade (aprox. 85-92%) em meio RPMI + 10% de SFB (frasco de 25 e 50 cm<sup>2</sup>) por 48 h foi preparado para armazenamento. O sobrenadante foi cuidadosamente removido com pipeta de vidro (10 mL), células expandidas e aderidas foram desprendidas sob agitação manual com adição de RPMI + 10 % SFB, evitando a formação de bolhas. Em seguida fez contagem celular e centrifugação (1400 rpm, 3 min). Após remoção do sobrenadante, adicionou-se o agente crioprotetor (9:1, SFB:DMSO, v/v, HARLOW & LANE, 1988; KAWAMURA, informação pessoal) e imediatamente, 0,5 mL de suspensão com 10<sup>6</sup> cel/mL foi alíquotada em criotubo de 2 mL. A seguir, acondicionou-se em recipiente especial (*Bio Freezing Vessel, Bicell*) para submeter ao congelamento lento a -86 °C por 24 h (três criotubos em três dias diferentes). Os criotubos foram transferidos em recipiente de N<sub>2</sub> líquido (- 185 °C).

#### 5.1.2.5 Confeção de CIA Affi-gel 10 com AcM produzido

##### **Preparo de AcM**

A confecção de CIA foi otimizada, tendo como referência a CIA com melhor desempenho na experiência de Silva (2010), preparada com 5 mg de AcM (produzido

por Hibridoma OTA.1) em 1 mL de gel, e apresentou taxa de imobilização de  $86,43 \pm 1,65$  % e retenção de  $72,08 \pm 1,41$  % de OTA.

Seis colunas experimentais foram confeccionadas utilizando 5 mg de AcM produzido por Hibridoma OTA.1 e purificado, procedendo precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 60% de saturação (Figura 14).

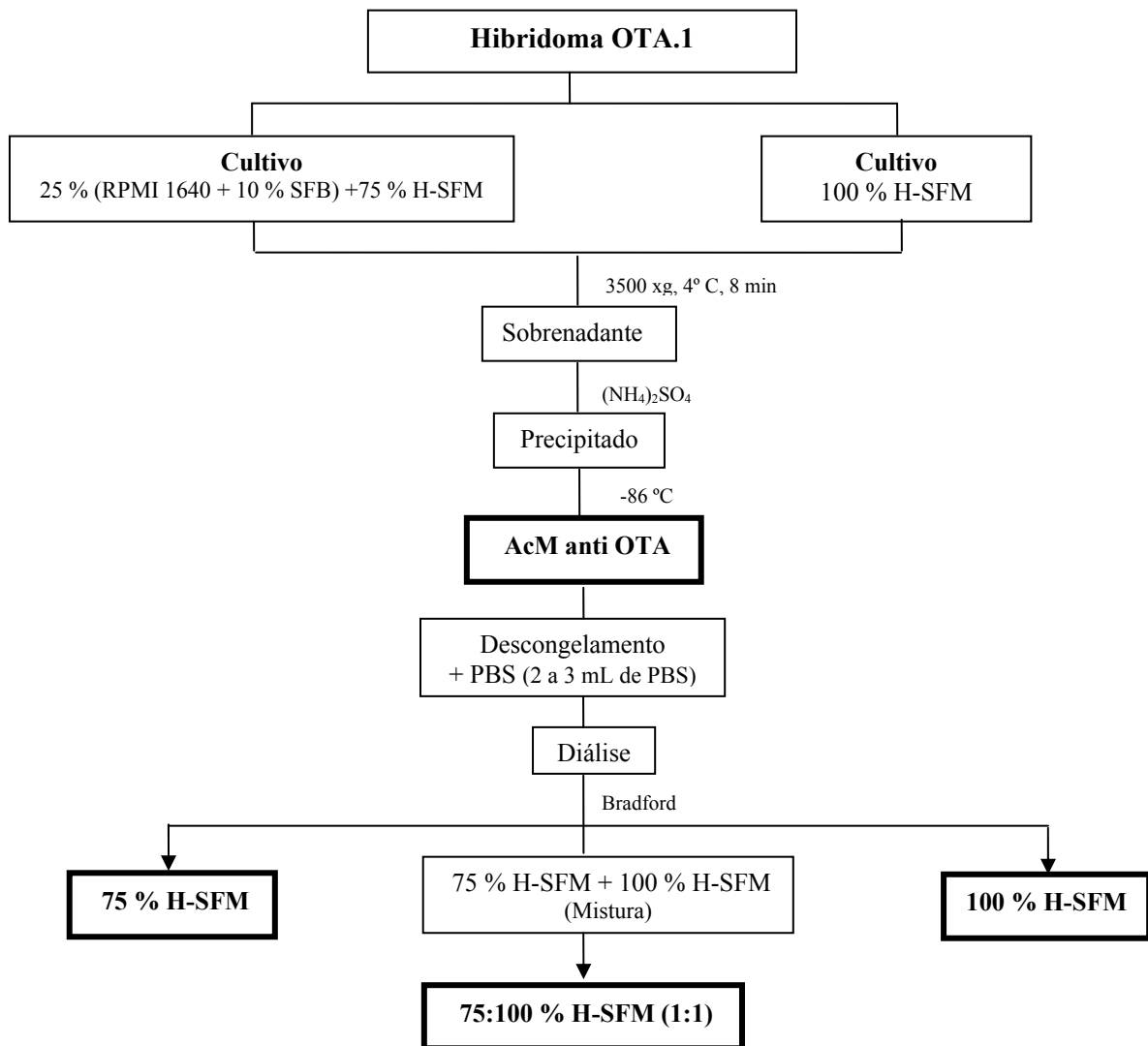
O AcM foi denominado de:

(i) 75 % H-SFM, correspondente ao AcM produzido no meio preparado com 25 % (RPMI +10 % SFB) adicionado de 75 % de meio H-SFM;

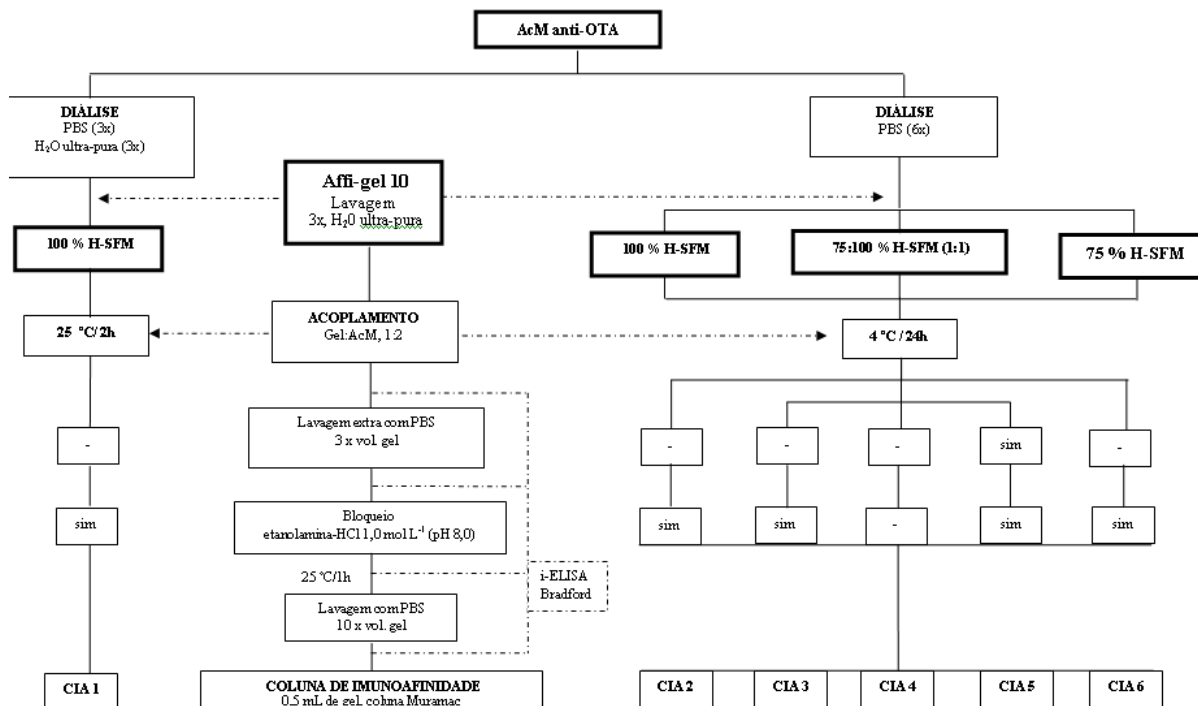
(ii) 75:100 % H-SFM (1:1), correspondente à mistura contendo proporção 1:1 de AcM produzido no meio 25 % (RPMI + 10 % SFB) adicionado de 75 % de meio H-SFM, e mesma quantidade de AcM produzido no meio 100 % H-SFM;

(iii) 100 % H-SFM, correspondente ao AcM produzido no meio 100 % H-SFM.

Consequentemente, as seis CIAs experimentais, confeccionadas com 5 mg de AcM consistiram de: 75 % H-SFM (uma CIA); mistura 75:100 % H-SFM 1:1 (três CIAs) e 100 % H-SFM (duas CIAs), empregando 1,0 mL de Affi-gel 10 como suporte.

**Figura 14** – O AcM anti-OTA empregado na confecção de CIA

**Figura 15** – Esquema da confecção de seis colunas de imunoafinidade baseado em suporte Affi-gel 10 e AcM anti-OTA 100 % H-SFM (CIA 1 e 2); 75:100 % H-SFM (1:1) (CIA 3, 4 e 5); e 75 % H-SFM (CIA 6). O filtrado recolhido após etapa pós-acoplamento; pós-lavagem extra com PBS; pós-bloqueio e pós-lavagem com PBS foram avaliadas por Bradford e ELISA indireto.



### Desenvolvimento de CIA

A Figura 15 apresenta o fluxo esquemático do desenvolvimento das CIAs confeccionadas com AcM anti-OTA produzidos no item anterior.

No estudo preliminar, o AcM foi dialisado com PBS (3x) seguida de H<sub>2</sub>O ultra-pura (3x); a coluna preparada com 5 mg de AcM, sob tempo de acoplamento de 25 °C/2h, foi denominada de CIA 1.

Nos experimentos seguintes, o AcM 100% dialisado em PBS/água ultra-pura foi liofilizado, e AcM necessário para confecção das próximas CIAs foi dialisada somente com PBS (6x); a coluna preparada com 5 mg de AcM, sob tempo de acoplamento de 4 °C/24 h, foi denominada de CIA 2 (AcM 100 % H-SFM); CIA 3, 4 e 5 (AcM mistura 75:100 % H-SFM 1:1); CIA 6 (AcM 75 % H-SFM).

O AcM anti-OTA dialisado foi adicionado de Affi-Gel 10, previamente lavado 3x com água ultra-pura a 4°C (volume igual a três vezes o volume do gel). A proporção gel:AcM foi de 1:2 em todos os experimentos, descrevendo-se a seguir, as etapas em detalhe.

### **CIA 1**

O acoplamento de AcM anti-OTA 100 % H-SFM no Affi-Gel 10 foi realizado a 25 °C/2 h sob agitação orbital lenta em homogeneizador (BHS\_300, Benfer, Brasil). O gel foi filtrado à vácuo para retirar o AcM não acoplado (teor protéico e atividade anti-OTA avaliados no filtrado), seguido de adição da solução de bloqueio etanolamina-HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) para recobrimento de sítio ativo não acoplado. Após incubação a 25 °C/1 h, a solução de bloqueio foi retirada por filtração (teor protéico e atividade anti-OTA avaliados no filtrado) e o gel lavado com PBS 0,015 mol L<sup>-1</sup> pH 7,3 (10 vezes o volume do gel, sendo o volume dividido em dez alíquotas para proceder-se dez lavagens por filtração). O filtrado correspondente a décima lavagem foi guardado para avaliação do teor protéico e atividade anti-OTA. O gel acoplado foi distribuído em alíquotas de 0,5 mL em colunas de polipropileno e armazenada em PBS-azida 0,02% a 4 °C.

### **CIA 2**

O acoplamento de AcM anti-OTA 100 % H-SFM no Affil-gel 10 foi a 24 h/4 °C sob agitação orbital lenta. O gel foi filtrado à vácuo e adicionou-se solução de bloqueio etanolamina-HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0). Após incubação por 1 h/25 °C a solução de bloqueio foi retirada por filtração e o gel lavado com PBS (10 vezes o volume do gel).

### **CIA 3**

O acoplamento de AcM anti-OTA 75:100 % H-SFM (1:1) no Affil-gel 10 foi a 24 h/4 °C sob agitação orbital lenta. O gel foi filtrado à vácuo e adicionou-se solução de bloqueio etanolamina-HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0). Após incubação por 1 h/25 °C a solução de bloqueio foi retirada por filtração e o gel lavado com PBS (10 vezes o volume do gel).

### **CIA 4**

O acoplamento AcM anti-OTA 75:100 % H-SFM (1:1) no Affil-gel 10 foi a 24 h/4 °C sob agitação orbital lenta. Após incubação, procedeu-se filtração e o gel lavado com PBS (10 vezes o volume do gel).

### **CIA 5**

O acoplamento AcM anti-OTA 75:100 % H-SFM (1:1) no Affil-gel 10 foi a 24 h/4 °C sob agitação orbital lenta. O gel foi filtrado à vácuo, em seguida foi feita a lavagem com PBS ( três vezes o volume do gel), o filtrado foi guardado para avaliação do teor protéico

e atividade anti-OTA. Adicionou-se a solução de bloqueio etanolamina-HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) e após incubação por 1 h/25 °C a solução de bloqueio foi retirada por filtração e o gel lavado com PBS (10 vezes o volume do gel).

### **CIA 6**

O acoplamento AcM anti-OTA 75 % H-SFM no Affil-gel 10 foi a 24 h/4 °C sob agitação orbital lenta.. Adicionou-se solução de bloqueio etanolamina-HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) e após incubação por 1 h/25 °C a solução de bloqueio foi retirada por filtração e o gel lavado com PBS (10 vezes o volume do gel).

#### 5.1.2.6 Avaliação da eficiência do acoplamento

A concentração de AcM IgG anti-OTA foi determinada previamente por método de Bradford. Após cada etapa da confecção da CIA coletou-se a solução remanescente, sendo pós-acoplamento, pós- lavagem extra, pós-bloqueio com etanolamina e após a 10<sup>a</sup> lavagem com PBS para avaliação do teor de proteínas. A quantidade de proteína imobilizada no gel foi calculada por diferença entre a quantidade de proteína em solução antes e após a imobilização, sendo o cálculo representado pela Equação (1):

$$\text{Eficiência de acoplamento (\%)} = \frac{(\text{proteína total} - \text{proteína sobrenadante}^*)}{100} \times 100 \quad (1)$$

Proteína total

\*Proteína sobrenadante (pós-acoplamento+ pós- lavagem extra + pós-bloqueio + pós 10<sup>a</sup> lavagem PBS)

#### 5.1.2.7 Metodologias adicionais empregadas durante e após o cultivo de Hibridoma OTA.1

### **Contagem de células viáveis**

Uma alíquota de 50 µL de suspensão celular foi adicionada de 50 µL de corante vital Azul de Trypan a 0,25 % em tampão fosfato salino- PBS 0,015 mol L<sup>-1</sup> pH 7,3 (p/v), conforme descrito por Harlow & Lane (1988). Após a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer pela Equação (2), a viabilidade celular foi expressa em porcentagem.

$$\text{Células viáveis/mL} = (\text{Células viáveis} / \text{número de quadrantes}) \times 2 \times 10^4 \quad (2)$$

### **Precipitação de AcM IgG anti-OTA com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

O sobrenadante de cultura com AcM foi adicionado sulfato de amônio a 60 % de saturação (390 g/L de sobrenadante) sob agitação lenta para purificação parcial de IgG. O precipitado protéico foi mantido a 4 °C por 16 horas sob agitação, centrifugado em tubos falcon de 50 mL (9000 xg, 4 °C, 30 min) e mantido a -86 °C até o uso. A diálise foi realizada empregando-se PBS (6x) ou PBS (3x)/ água ultra-pura (3x), a 4° C por 16 h para remoção de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A concentração proteica (IgG) foi determinada no sobrenadante pré e pós diálise e atividade do AcM averiguado por ELISA indireto.

### **Avaliação da atividade de AcM anti-OTA por ELISA indireto**

A presença de IgG anti-OTA no sobrenadante de cultura (atividade) foi determinada por ELISA indireto (KAWAMURA *et al.*, 1989). A microplaca de poliestireno (96 poços) foi revestida com 100  $\mu\text{L}$  de solução de conjugado OTA-BSA em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 9,6 e incubada a 4 °C/18 h. A microplaca foi lavada 4x com PBST 0,05%, e 200  $\mu\text{L}$  de ovoalbumina a 0,1 % em PBS adicionada para bloqueio e incubada a 25 °C/4 h. Após lavagem como descrito acima, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de amostra e incubada a 4 °C/18h Após lavagem, 100  $\mu\text{L}$  de conjugado anti-IgG ligado a HRP foi adicionado e incubado a 25 °C/1h. A microplaca foi lavada por 6 vezes, seguida de adição substrato cromógeno 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB) a 25 °C/20 min. A reação enzimática foi interrompida com 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e a absorvância lida a 450 nm.

### **Determinação de proteína pelo método de Bradford**

A concentração protéica foi determinada por método de Bradford (1976) modificado para microensaio (microplaca de fundo plano com 96 poços). A curva padrão de proteína foi confeccionada com 10 $\mu\text{L}$  de soro albumina bovina (BSA) nas concentrações de 31; 25; 62,5; 125; 175; 200; 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (suspendida em PBS 0,015 mol L<sup>-1</sup> ( pH 7,3). O volume de 100 $\mu\text{L}$  do reativo de Bradford foi adicionado à reação e lida a 650nm.

### ***Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE)***

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970), foi realizada para avaliar a pureza de AcM produzido pelo hibridoma OTA.1 no meio 100 % de H-SFM. O AcM anti-OTA (666  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi diluído em tampão de amostra 3x concentrado, e alíquota da amostra correspondente a 33,3  $\mu\text{g}$  de proteína foi aplicada no gel

paralelamente com 10  $\mu\text{L}$  do padrão de marcador molecular. O gel de concentração (*stacking*) foi de 5 % de acrilamida, e de corrida (*running*) 12 %. Após a corrida, o gel foi corado com solução de *Coomassie blue* (7 mL ácido acético + 50 mL de metanol + 0,25 g de comassie brilhante blue R-250 + água destilada para completar 100 mL) e descorado com ácido acético:metanol:água (1:4:5; v/v/v), para visualização e distinção de bandas proteicas.

#### 5.1.2.8 Soluções

##### **Tampão carbonato-bicarbonato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 9,6**

Soluções estoque

A: Carbonato de sódio anidro 0,2 mol L<sup>-1</sup>

B: solução bicarbonato de sódio anidro 0,2 mol L<sup>-1</sup>

(32 mL de solução A + 68 mL de solução B): água ultra-pura; (1:1)

##### **Tampão fostato salina (PBS) 0,015 mol L<sup>-1</sup> pH 7,3**

8,0 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1L água ultra-pura

##### **Tretametilbenzidina**

10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5,0 + 100  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 % + 100  $\mu\text{L}$  (10 mg de 3,3',5,5'tretametilbenzidina + 1 mL de dimetilsulfóxido)

#### 5.1.2.9 Análise estatística

O resultado referente ao desenvolvimento de CIA Affi-gel foi resumido por meio análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5 % de significância), utilizando-se o software Statistic 7.0 (Stat Soft, Inc.).

#### 5.1.3 Resultados e Discussão

##### 5.1.3.1 Cultivo de hibridoma OTA.1 e purificação de AcM produzido em meio sintético

A Figura 16 mostra o fluxograma do cultivo de Hibridoma OTA.1 realizado em duas etapas, seguida de purificação e obtenção de AcM anti-OTA. Considerando que o

primeiro cultivo de Hibridoma OTA.1 (34 dias) não produziu quantidade suficiente de AcM anti-OTA para o desenvolvimento de coluna de imunafinidade, procedeu-se o segundo cultivo adicional (63 dias), com descrição detalhada de otimização (item 3.1.2)

#### 5.1.3.1.1 Primeiro cultivo celular (preliminar)

O criotubo (0,5 mL,  $20 \times 10^5$  células/mL, mantido em N<sub>2</sub> líquido por 530 dias) congelado no dia 26/06/2009, submetido ao descongelamento rápido (Banho-maria a 37 °C), apresentou contagem de  $0,28 \times 10^5$  células/mL e viabilidade de 61 %. Considerando que o hibridoma mantido no meio RPMI 1640 + 45 % SFB adicionado de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-glutamina e renovação diária de meio apresentou-se disforme, com membrana pouco refringente e baixa contagem (três dias), no quarto dia enriqueceu-se o meio para concentração total de  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-glutamina; o procedimento propiciou a adaptação celular, atingindo contagem de  $1,6 \times 10^5$  células/mL, taxa de viabilidade de 98,4 %, apresentando atividade anti-OTA confirmando produção de AcM por i-ELISA. A criopreservação com DMSO por longo período manteve a característica biológica de hibridoma, incluindo a capacidade de produção de AcM (HARLOW & LANE, 1988). Wewetzer & Dilmaghani (2001) mostraram aumento na viabilidade celular de hibridomas incubadas a 37 °C em meio contendo DMSO.

O enriquecimento com L-glutamina favoreceu o crescimento celular, sendo a cinética de hibridoma dependente da concentração de substratos e produtos. A glutamina e a glicose são substratos essenciais para o hibridoma. A glutamina desaminada resulta em amônio e glutamato, que inserindo no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), produz ATP, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A glicose é transformada em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pelo ciclo do ácido carboxílico, e parcialmente convertido em ácidos graxo e láctico. A alta concentração de amônio e lactato constituem produtos finais inibidores de crescimento celular (LEGAZPI *et al*, 2005). A suplementação com alta porcentagem inicial de SFB favoreceu a adaptação celular, fornecendo fator hormonal, mineral, lipídeo, eletrólito, carboidrato, enzima e outros nutrientes essenciais, além de regular permeabilidade membranar e conter carreador de micronutriente (STAINES & PRICE, 2003).

Uma porção do cultivo foi submetida ao congelamento para novo estoque, ao atingir contagem entre  $10^6$  a  $10^7$  células/mL; a etapa correspondeu à fase logaritmica, sendo fator essencial ao congelamento adequado e maior recuperação pós-estocagem

(HARLOW & LANE, 1988). Três congelamentos sucessivos apresentaram a contagem de  $32,3 \times 10^5$ ;  $63,5 \times 10^5$ ;  $38 \times 10^5$  células/mL.

Paralelamente, o incremento de H-SFM visou reduzir SFB pelo custo, perigo de contaminação por vírus, príon e micoplasma, composição indefinida e alta concentração de imunoglobulina, sendo o último capaz de dificultar a purificação de AcM (STAINES & PRICE, 2003; LEGAZPI *et al.*, 2005).

O cultivo sucessivo até o 34º dia resultou em 3000 mL de sobrenadante do meio 100 % H-SFM (total de 618,00 mg de proteína, 206,2 µg/mL), valor superior ao relatado por Harlow & Lane (1988), estimado em 50 µg/mL de AcM no cultivo em meio sintético e 78,13 µg/mL de AcM por Fujii (2007-b).

A purificação de AcM utiliza cromatografia de troca iônica e separação empregando proteína A ou G (ABBAS *et al.*, 2011). Fujii (2007b) obteve 27,96 % de recuperação de AcM anti-OTA produzida pelo Hibridoma OTA.1 em coluna de proteína G e 80,82 % com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Silva (2010) obteve melhor rendimento com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 60% de saturação em sobrenadante do cultivo de 75 e 100 % H-SFM.

A experiência no primeiro cultivo melhorou a performance de reativação e adaptação de hibridoma. O uso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 60% de saturação foi selecionado para purificação de AcM em etapas seguintes, pelo baixo custo e toxicidade.

#### 5.1.3.1.2 Segundo cultivo: otimização

##### **Reativação e adaptação gradual no meio RPMI 1640 (redução de SFB)**

No segundo cultivo, o criotubo (0,5 mL,  $32,6 \times 10^5$  células/mL, congelado em 29/01/2011, mantido em  $\text{N}_2$  líquido por 157 dias) foi submetido a descongelamento rápido em banho-maria a 37° C, lavado com 9 mL de meio RPMI 1640 adicionado de 1 mL de SFB (1400 xg / 3 min), e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI 1640 + 40 % SFB e distribuído: 5 mL para o cultivo em frasco de 25 cm<sup>2</sup>, 4,95 mL para microplaca de 24 poços (utilizou-se 5 poços, aproximadamente 1 mL/poço) e 50 µL para contagem celular. A suspensão apresentou contagem de  $2,83 \times 10^5$  células/mL e viabilidade pós-congelamento de 30,13 %, com decréscimo de 91,32 % da contagem inicial de células pós-descongelamento em relação ao criotubo congelado.

A adaptação celular foi gradual, com troca diária de meio, reduzindo o SFB inicial de 40 % até atingir 10 % final, sendo a redução de 5 %, conforme aspecto celular. Por exemplo, as células não apresentavam o perfil adequado no quarto dia, portanto manteve o

cultivo na mesma porcentagem de 30 % SFB, e reiniciando a redução baseada no comportamento de adaptação celular. A redução gradual de SFB foi de 35, 30, 25, 20, 15 e 10 % por 10 dias (Figura 17-b). A viabilidade celular variou de 6,38 a 98,05 %, com viabilidade maior que 90% do 6° ao 10° dia, e contagem celular  $10^6$  células/mL no 10° dia (Figura 17-a), apontando o tempo propício para realizar o congelamento de células, em etapa gradual de  $-86$  °C a  $-185$  °C.

### **Expansão celular: produção de AcM IgG no meio sintético H-SFM**

A mesma Figura 17-a mostra a expansão do Hibridoma OTA.1 (11° ao 63° dia), procedendo adaptação gradual no meio sintético H-SFM em frasco de 50 e 75 cm<sup>2</sup>, para reduzir o teor de proteínas interferentes. O procedimento consistiu na adição gradual de 15, 30, 50, 75, 80 e 100% de meio H-SFM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 2 mmol L<sup>-1</sup> de glutamina, com a troca de meio em dias alternados, até o final de cultivo.

A viabilidade celular variou de 50,23 a 91,73 % e contagem de  $4,05 \times 10^5$  a  $17,5 \times 10^5$  células/mL (Figura 17-a). A menor viabilidade ocorreu no 22° dia (troca de meio 80 % H-SFM no 19° dia), devido à exaustão de nutrientes e acúmulo de metabólitos indesejáveis (LEGAZI *et al.*, 2005). Iniciando a fase de adaptação com 75 % H-SFM, a viabilidade manteve-se entre 60 a 75 % (17° a 58° dia); a viabilidade manteve-se em torno de 82 % nos últimos cinco dias, apresentando poucas células mortas (Figura 17-c). A introdução gradual de meio H-SFM causou redução na contagem celular a partir de 16° dia (50 % H-SFM), mas mantendo em torno de  $10^5$  células/mL até o final de cultivo. Neste segundo cultivo, a expansão em 100 % H-SFM produziu sobrenadante com 216,70 mg de proteína ( $33,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 6500 mL).

A Figura 18-a mostra o perfil eletroforético de AcM produzido em cultivo 100 % de H-SFM, indicando o grau de pureza do produto obtido. A obtenção de duas bandas indica que o mercaptoetanol quebrou pontes de dissulfeto de AcM (aproximadamente 150 kDa), resultando em bandas de cadeia leve (25kDa) e pesada (50 KDa). Em comparação (Figura 18-b), AcM anti-aflatoxina produzido por Hibridoma AF2 e AF4 em meio RPMI mostra presença de proteínas interferentes em relação a H-SFM (TAKABAYASHI, 2009).

Outrossim, cuidados especiais são requeridos na manutenção dos hibridomas. Pesquisadores tem observado a perda da produtividade de AcM ao longo prazo em cultivo de hibridoma, coincidindo com o aparecimento de população com baixos níveis de AcM intracelular. Especula-se que a perda de produtividade seja devida a mutação

cromossomal, estabilidade do RNA mensageiro afetado ou com a idade da cultura, durante a adaptação celular em meio livre de soro (MCKINNEY *et al.*, 1995).

#### 5.1.3.2 Otimização de coluna de imunoafinidade baseado em suporte Affi-gel 10

O desenvolvimento de CIA iniciou-se com Fujii (2007b), confeccionando CIA com AcM anti-OTA produzido por Hibridoma OTA.1 em imunossuporte sílica-hidrazida, e obteve 69,72 % de imobilização de AcM. O delineamento experimental para a confecção de colunas deste trabalho baseou-se no trabalho anterior conduzido por Silva (2010), que obteve melhores resultados com CIA desenvolvido com AcM 75:100 % H-SFM (1:1), acoplado em Affi-gel 10 a 25 °C /2h.

Considerando maior pureza de AcM no cultivo 100 % de H-SFM (Figura 18-a), e conseqüente maior sensibilidade para a coluna proposta, a confecção de CIA 1 (Figura 19) iniciou-se procedendo as mesmas etapas de Silva (2010), mas substituindo o AcM 75:100 % H-SFM (1:1) por AcM 100 % H-SFM (Figura 15). A Figura 20-a mostrou menor rendimento de CIA 1 confeccionada, obtendo 77,43 % de AcM anti-OTA imobilizada, em relação ao 86,43±1,65 % obtido por Silva (2010), contrastando com o resultado esperado.

Investigando os materiais e procedimentos empregados para o preparo de CIA em ambas as condições, salienta-se que:

A CIA desenvolvida por Silva (2010) utilizou AcM 75:100 % H-SFM (1:1) concentrado pelo processo de ultra-filtração, resultando em 6,0 e 1,3 mg/mL de proteína total, seguida de precipitação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O *pellet* dialisado em PBS/água ultra-pura foi diluída em PBS, na proporção gel: AcM anti-OTA de 1:2. Em comparação, a CIA 1 empregou AcM 100 % H-SFM sem etapa de concentração por ultra-filtração, portanto com 233 µg/mL de proteína total, bastante inferior ao AcM anteriormente obtido na faixa de mg (SILVA, 2010). Isso não requereu diluição de AcM para confeccionar CIA 1, e o AcM foi dialisado 3x em PBS e 3x em água ultra-pura. A CIA 1 apresentou taxa de imobilização de 77,43±6,39 %, correspondente a 3,88±0,32 mg de Ac imobilizado por mL de gel (Tabela 2).

Provavelmente esta etapa de diálise com água ultra-pura desnaturou o AcM, causando perda de atividade anti-OTA, analisada por i-ELISA (Figura 20-a, gráfico em azul). Paralelamente, também observou-se agregação de Ac em solução estocada, sendo que Chen *et al.* (2003) mencionaram a formação de AcM anti-IL 8 humana (ABX-IL8; IgG2) de alta massa molecular em solução aquosa a 2-8 °C ou 25 °C. Fatores exógenos afetaram a estabilidade da proteína durante produção, armazenamento, transporte e manuseio, a exemplo

de temperatura (ciclos de congelamento) e condição da solução (pH, adição de surfactante ou estabilizador). As reações de instabilidade física incluem denaturação, agregação, precipitação e adsorção de proteína, resultante da exposição de sítio hidrofóbico. A proteína denaturada contém falha na conformação terciária e secundária, causando instabilidade protéica (MAHLER *et al.*, 2005).

Outro fator responsável pela baixa taxa de imobilização provavelmente seja o acoplamento à 25 °C /2 h (CIA 1), enquanto que o fabricante de Affi-gel 10 recomenda o processo à 4 °C (BIO-RAD LABORATORIES, 2012).

Assim, para as CIAs seguintes (2 a 6) procedeu-se o acoplamento a 4 °C/24 h, conforme Kondo *et al.* (1996-b), e comparou-se o desempenho de AcM 100 % H-SFM; AcM 75:100 % H-SFM (1:1) e AcM 75 % H-SFM (Figura 15). Além disso, a primeira etapa da confecção de CIAs 2 a 6 iniciou-se dialisando o *pellet* de AcM anti-OTA [precipitado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] com PBS (6x, sem etapa de água ultrapura). Outrossim, as CIAs 2, 3, 4, e 5 continham uma parcela adicional de AcM 100 % H-SFM dialisado com PBS (3x), seguida de água ultrapura (3x), e mantido liofilizado. Esta parcela de AcM 100 % H-SFM dialisado em água ultra-pura e liofilizado pode causar alteração adicional na estrutura do AcM, já que variação de temperatura desnatura a proteína. Anticorpo em tampão fosfato de sódio mantido entre 25 a -30 °C causou grande alteração de pH em relação tampão de hidrócloro de histidina, acetato de sódio, acetato de histidina, citrato e succinato com variação de pH <1,0 (KOHLE *et al.*, 2010).

A CIA 2 apresentou taxa de imobilização de 97,55±0,24 % no suporte Affi-gel 10 (Tabela 2). Não obstante, a CIA 2 (Figura 20–b) mostrando AcM anti-OTA inicial com maior atividade (leitura de absorvância maior, gráfico em azul) em relação a CIA 1 (Figura 20-a), confirma a perda de atividade de AcM devido ao uso de água ultra-pura.

A CIA 3 confeccionada com AcM 75: 100 % H-SFM (1:1) apresentou taxa de imobilização de 93,84±0,23 % (Tabela 2), com acoplamento 7,5 % superior ao obtido por Silva (2010). O melhor desempenho decorreu pela alteração na temperatura e tempo na etapa de acoplamento, além de uso de AcM dialisado em PBS (Figura 20-c).

Para avaliar se a etapa de bloqueio poderia interferir na taxa de imobilização de OTA, confeccionou-se a CIA 4 com AcM 75: 100 % de H-SFM (1:1) sem etapa de bloqueio com etanolamina. A taxa de imobilização foi 94,55±1,00 %, correspondendo a 4,75±0,06 mg de AcM/mL de gel (Tabela 2).

Na confecção da CIA 5, adicionou-se etapa extra de lavagem com PBS (3x volume do gel) entre a etapa de acoplamento e bloqueio com etanolamina, com o intuito de

avaliar se a etanomina-HCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 8,0) removeria o AcM já imobilizado no gel. A taxa de imobilização foi de  $94,02 \pm 0,78 \%$ , correspondente a  $4,7 \pm 0,04 \text{ mg}$  de AcM/mL de gel (Tabela 2). A figura 20-e (gráfico em azul claro), mostra o AcM não acoplado removido na etapa antecedente ao acoplamento, já que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) com as metodologias que não aplicaram a etapa.

A CIA 6 desenvolvida com AcM 75 % H-SFM apresentou taxa de imobilização de  $94,72 \pm 0,49 \%$ , correspondendo a  $4,74 \pm 0,02 \text{ mg}$  de Ac/ mL de gel.

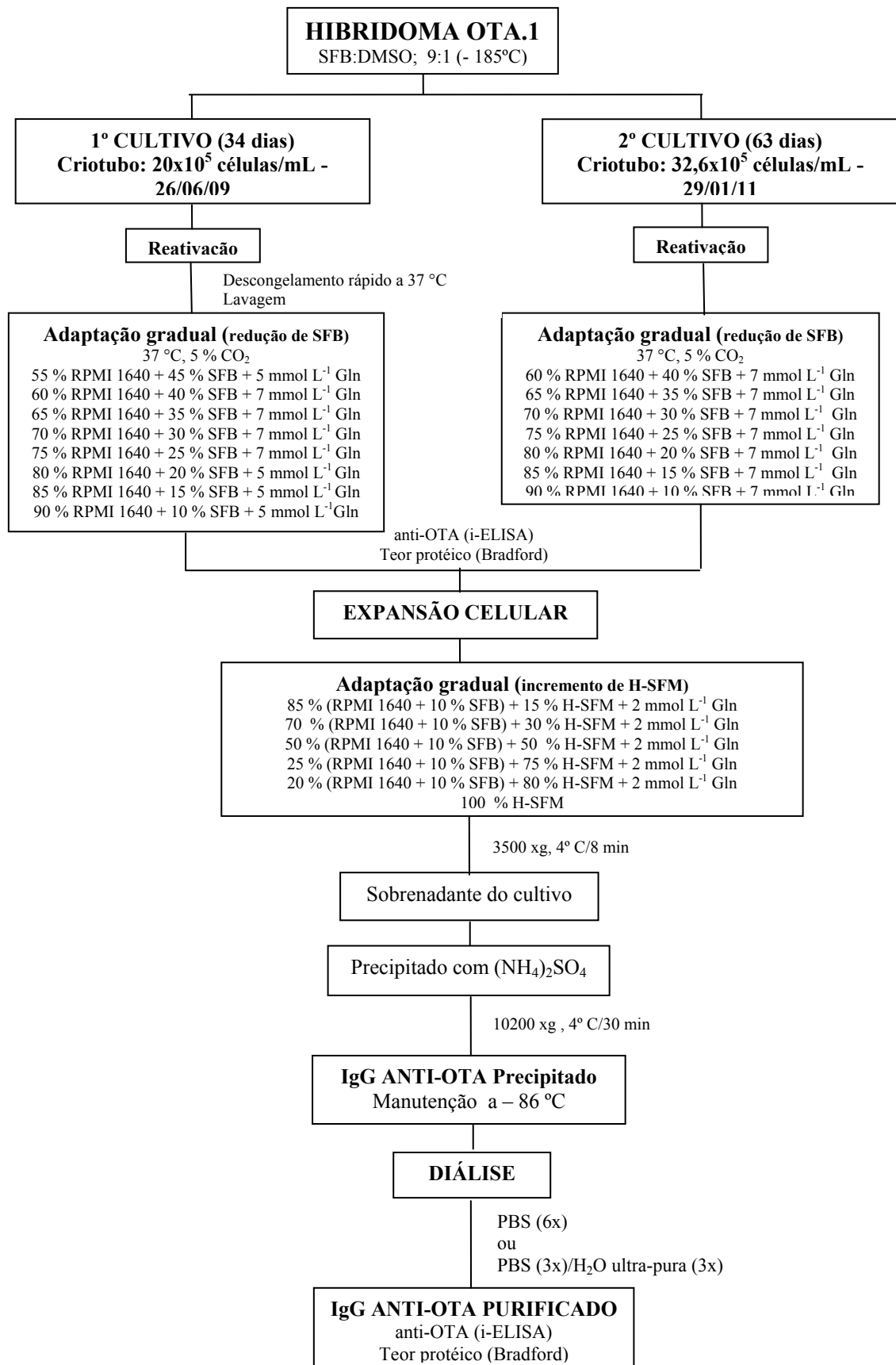
As altas taxas de imobilização, variando entre  $93,84 \pm 0,23$  a  $97,55 \pm 0,24 \%$  (CIA 2 a 6, Tabela 2), confirma a conduta adequada na otimização da confecção de CIA com AcM anti-OTA. Procedendo quantificação de proteína no filtrado, não houve diferença estatística entre as CIAs desenvolvidas com os AcM 75 % H-SFM; 75:100 % H-SFM (1:1) e 100 % de H-SFM, exceto CIA 1, com menor desempenho (Tabela 2). Portanto, as CIAs 3, 4, 5 e 6 preenchem requisitos adequados perante aplicação na análise de OTA.

Outrossim, comparando o desempenho de colunas confeccionadas (Figura 20), a análise de atividade anti-OTA no filtrado de CIA 6 apresentou menor perda de AcM anti-OTA, desde a etapa de pós-acoplamento (gráfico da Figura 20-f). Considerando que CIA 6 empregou AcM AcM 75 % H-SFM, supõe-se que as proteínas constituintes do cultivo protegeram o AcM durante confecção de CIA, permitindo melhor imobilização de AcM (94,72 %); provavelmente a perda de proteína seja decorrente de proteínas interferentes.

#### 5.1.4 Conclusão

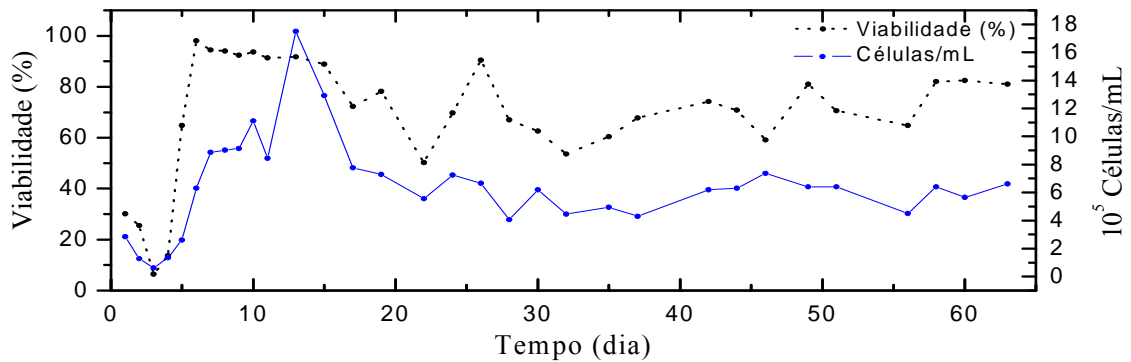
A otimização do cultivo de Hibridoma OTA.1 exigiu cuidados críticos desde a etapa de reativação e expansão celular, controlando crescimento através da observação do aspecto celular por microscopia e manipulação perante proporção do meio RPMI e SFB. I.e., controle visual diário do tempo requerido para incubação em cada proporção de meio, confirmando a adaptação celular e prosseguimento para próxima etapa de cultivo. Os detalhes minuciosos no cultivo constituíram o fator fundamental na obtenção de AcM visando confecção de CIA com melhor desempenho. Os estudos devem ser prosseguidos para avaliar a aplicação da CIA produzida com AcM cultivado em 75 % de H-SFM em diferentes matrizes alimentares, o resultado constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de imunobiotecnologia independente de importação.

**Figura 16** – Cultivo e manutenção de Hibridoma OTA.1 produtor de anticorpo anti-OTA.



SFB: Soro Fetal Bovino; H-SFM: Hibridoma-Serum Free Medium; DMSO: demitilsulfóxido; SDS- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

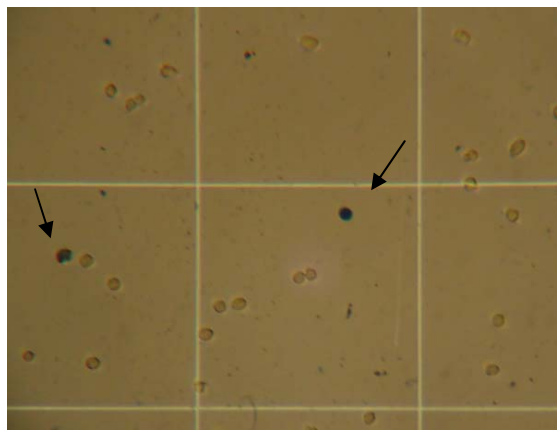
**Figura 17** – Segundo cultivo de Híbridoma OTA.1



**(a)** Viabilidade e contagem celular em cultivo de Híbridoma OTA.1

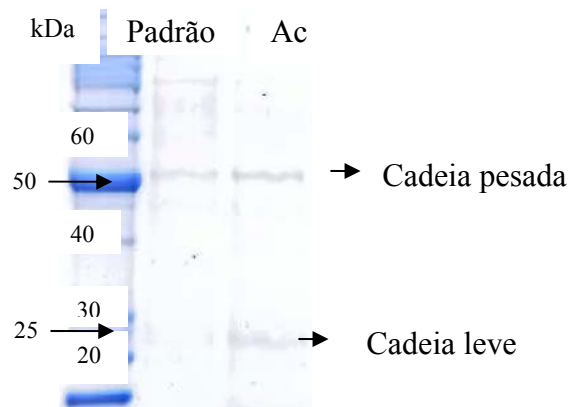
Tempo (dia)	Adaptação		Tempo (dia)	Expansão	
	RPMI 1640 (%)	SFB (%)		RPMI 1640 + 10 % SFB (%)	H-SFM (%)
1	60	40	11	85	15
2	65	35	13	70	30
3	70	30	15	50	50
4	70	30	17	25	75
5	75	25	19	20	80
6	75	25	22-63	0	100
7	80	20			
8	85	15			
9	90	10			
10	90	10			

**(b)** Adaptação (meio RPMI 1640 sob redução gradual de soro fetal bovino) e expansão (meio RPMI 1640 + 10 % SFB sob incremento de Híbridoma-SFM). SFB: Soro Fetal Bovino; H-SFM: Híbridoma-Serum Free Medium.

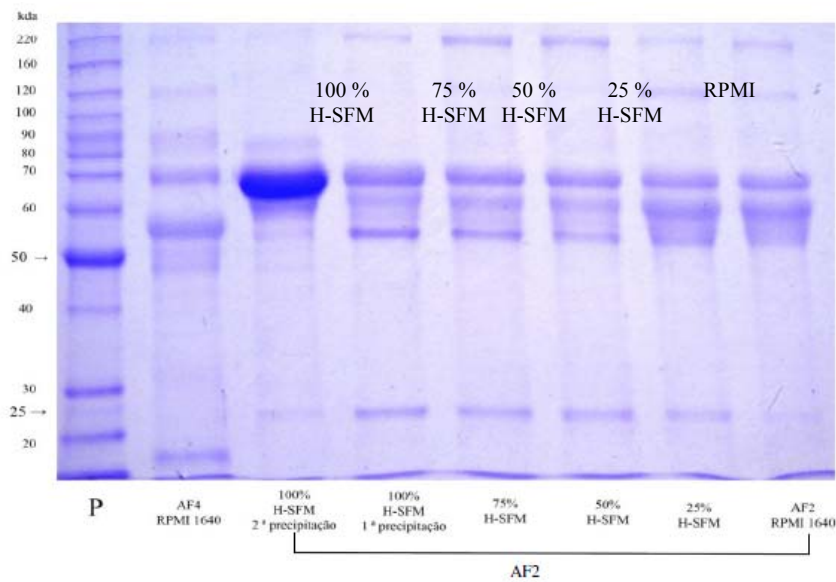


**(c)** Característica morfológica de células em câmara de Neubauer, seta indica célula morta

**Figura 18** –Perfil eletroforético de AcM em SDS-PAGE.Marcador de proteína (BenchMark™ protein ladder, Invitrogen, USA)



(a) AcM produzido por Hibridoma OTA.1 produzida durante adaptação em meio 100 % H-SFM

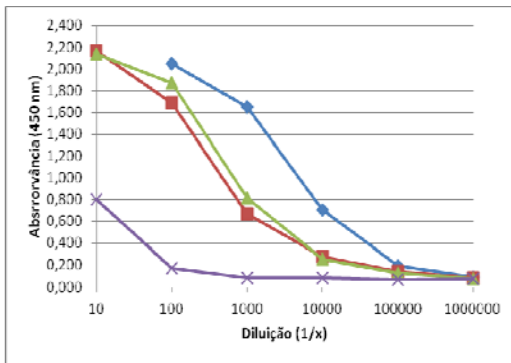


(b) AcM produzido por Hibridoma AF2 e AF4 em diferentes etapas de cultivo empregando meio H-SFM e RPMI ( Fonte: Takabayashi, 2009).

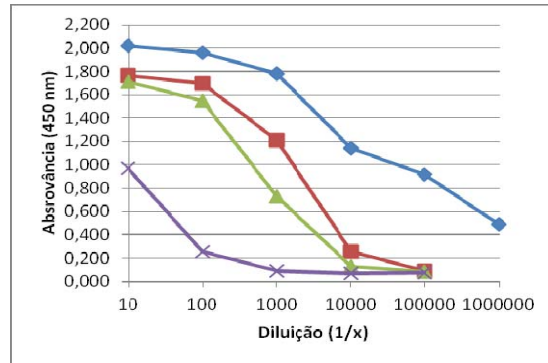
**Figura 19** –CIA desenvolvida em coluna de polipropileno (Muromac Columns, Japão) com 5mg de Ac por mL de gel/0,5 mL de gel.



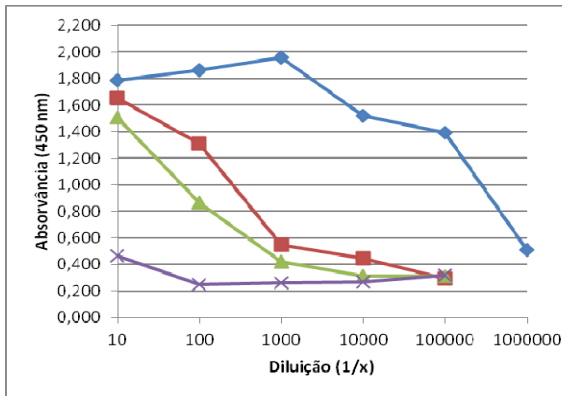
**Figura 20** – Atividade anti-OTA nas etapas de confecção de CIA com 5 mg/mL de gel



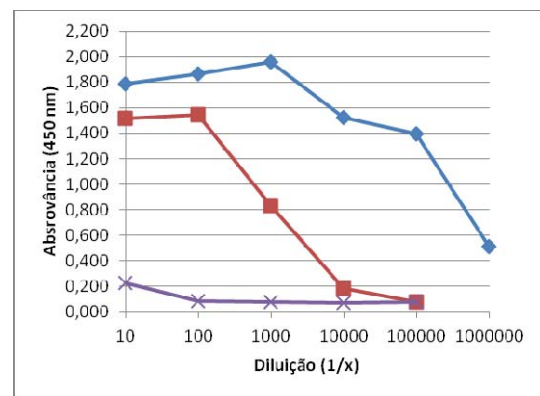
**(a)** AcM 100% HSFM, dialisado com PBS/ água ultra-pura, acoplamento 25°C /2 h



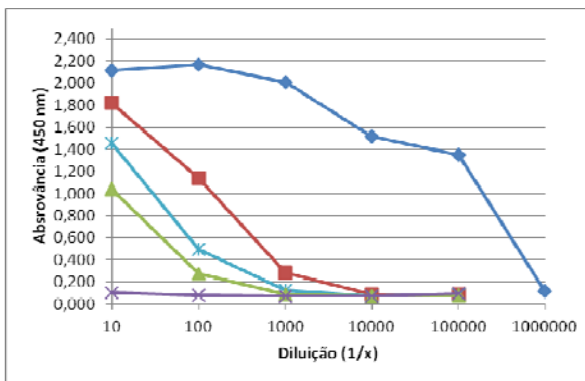
**(b)** AcM 100% HSFM, dialisado com PBS, acoplamento 4°C /24 h



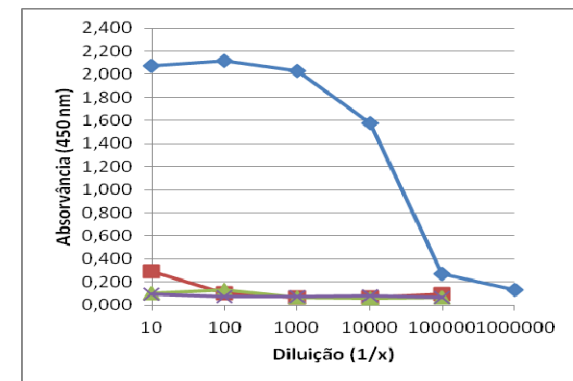
**(c)** AcM 75% HSFM: 100% HSFM (1;1), dialisado com PBS, acoplamento 4°C /24 h



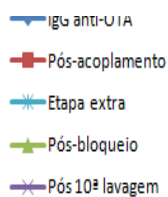
**(d)** AcM 75% HSFM: 100% HSFM (1;1), dialisado com PBS, acoplamento 4°C /24 h, sem etapa de bloqueio



**(e)** AcM 75% HSFM: 100% HSFM (1;1), dialisado com PBS, acoplamento 4°C /24 h, com etapa extra-lavagem



**(f)** AcM 75% HSFM, dialisado com PBS, acoplamento 4°C /24 h



**Tabela 2** – Caracterização de CIA confeccionada com 5 mg de Ac em suporte Affi-gel 10

Anti-OTA (5mg de AcM/mL de gel)	Alteração na etapa	CIA	AcM imobilizado		
			(%)	(mg/mL)	(mg/CIA)
100% H-SFM	Diálise PBS/ H <sub>2</sub> O ultra-pura	C1	77,43±6,39 <sup>b</sup>	3,88±0,32	1,94±0,16
	Acoplamento 4°C/24h	C2	97,55±0,24 <sup>a</sup>	4,88±0,01	2,44±0,01
75%: 100% H-SFM (1:1)	Acoplamento 4°C/24h	C3	93,84±0,23 <sup>a</sup>	4,69±0,01	2,34±0,01
	Etapa sem bloqueio	C4	94,55±1,00 <sup>a</sup>	4,75±0,06	2,38±0,04
	Etapa extra de lavagem	C5	94,02±0,78 <sup>a</sup>	4,7±0,04	2,36±0,02
75% H-SFM	Acoplamento 4°C/24h	C6	94,72±0,49 <sup>a</sup>	4,74±0,02	2,37±0,01
75%: 100% H-SFM (1:1)	Metodologia padrão*	-	86,43±1,65	4,3±0,07	2,2

\*Metodologia empregada por Silva (2010)

Letra diferente na mesma coluna tem diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Volume de CIA: 0,5 mL

## 5.2 QUALIDADE (CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, *TRANS*-RESVERATROL, COR) E SEGURANÇA (OCRATOXINA A) EM VINHO TINTO DA ARGENTINA E DO PARANÁ, BRASIL

**Resumo:** O consumo moderado de vinho é recomendado baseado em efeito benéfico à saúde, com ênfase para o resveratrol, derivado de fenólico, com ação quelante em radical livre oxidativo. A segurança na cadeia produtiva de vinho deve ser assegurada evitando contaminação por ocratoxina A (OTA) produzido por *Aspergillus*. O vinho argentino elaborado de *Vitis vinifera* (n=26), bem como o vinho paranaense, produzida a partir de *Vitis labrusca*-Bordô (n=34), foram avaliadas perante contaminação por OTA analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, Limite de detecção- LD =0,05 ng mL<sup>-1</sup> e Limite de quantificação - LQ= 0,07 ng mL<sup>-1</sup>) e ELISA competitivo indireto (ic-ELISA, LD= 0,17 ng mL<sup>-1</sup> e LQ= 0,32 ng mL<sup>-1</sup>). Em paralelo característica de qualidade foi avaliada por capacidade antioxidante (CAO), *trans*-resveratrol e parâmetros cromáticos (L\*, C\* e h<sub>graus</sub>). De um total de 60 amostras, apenas uma amostra (0,12 ±0.01 ng mL<sup>-1</sup>) apresentou contaminação de OTA por CLAE, e 11 por ic-ELISA, com nível de contaminação abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira e Comunidade Européia (2 ng mL<sup>-1</sup>). A detecção de OTA por ic-ELISA foi explicado pela relação de *trans*-resveratrol e OTA por Análise de Componentes Principais (ACP), mostrando a influência de interferência de matriz. O vinho elaborado com Bordô apresentou níveis de capacidade antioxidante de 2,79±0,00 a 8,21±0,18 mmol L<sup>-1</sup> com média de 4,57 mmol L<sup>-1</sup>; enquanto a mesma análise em vinho elaborado com *V. vinifera* variaram de 6,63±0,39 a 9,18±0,06 mmol L<sup>-1</sup>, com média de 8,35 mmol L<sup>-1</sup>. O *trans*-resveratrol em 57 amostras de 60, variaram de 0,34±0,08 a 16,4±0,04 mg L<sup>-1</sup> (CLAE-PDA, LD=0,01 mg L<sup>-1</sup> and LQ=0,03 mg L<sup>-1</sup>). As amostras de vinho Argentino (1,35 mg L<sup>-1</sup>) mostraram nível mais baixo de *trans*-resveratrol em relação ao vinho Bordô (3,33 mg L<sup>-1</sup>) (p<0,05). O vinho de Paraná apresentou maior luminosidade em relação ao argentino, i.e., cor mais clara, entretanto valores de croma e tonalidade cromática não diferiu estatisticamente (p>0,05). Os vinhos sul-americanos mostraram perfil interessante apresentando nível alto de antioxidante em detrimento a baixa contaminação por OTA, podendo oferecer efeito benéfico na saúde humana. Além disso, o conhecimento de interferência de *trans*-resveratrol em ic-ELISA permitirá o aperfeiçoamento do emprego de imunorreagente de excelente qualidade em nanotecnologia.

**Palavras-chaves:** Vinho Bordô. *Vitis vinifera*. Antioxidante. Parâmetro cromático

Quality (antioxidant capacity, *trans*-resveratrol, color) and safety (ochratoxin A) in red wine of Argentine and Paraná state, Brazil

**Abstract:** Moderate consumption of wine is recommended due to benefic health effect, with emphasis on of resveratrol, which is derived from phenolic compounds, with quenching action on oxidative free radicals. The safety of wine productiveness chain should be ensured by avoiding contamination of ochratoxin A (OTA) producing *Aspergillus* spp. The Argentinean wine produced with *Vitis vinifera* (n=26), as well as Paraná wine produced with *Vitis labrusca*- Bordeaux (n=34), were evaluated concerning OTA contamination by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Limit of detection - LD =0.05 ng mL<sup>-1</sup> and Limit of quantification - LQ= 0.07 ng mL<sup>-1</sup>) and indirect competitive ELISA (ic-ELISA, LD=

0.17 ng mL<sup>-1</sup> and LQ= 0.32 ng mL<sup>-1</sup>). In parallel to quality characteristic targeted on antioxidant capacity (AC), *trans*-resveratrol and chromatic parameter (L\*, C\* e h°). A total of 60 samples, only one sample (0.12 ±0.01 ng mL<sup>-1</sup>) showed OTA contamination by HPLC and 11 samples by ic-ELISA, with levels below the limit established by Brazilian legislation and European Community (2 ng mL<sup>-1</sup>). The OTA detection by ic-ELISA was explained with the relationship of *trans*-resveratrol and OTA analyzed by Principal Component Analysis (PCA), showing the influence of matrix interference. The Bordeaux wine showed antioxidant capacity level ranging from 2.79±0.00 to 8.21±0.18 mmol L<sup>-1</sup> with mean 4.57 mmol L<sup>-1</sup>, while the same profile analysis in *V. vinifera* wine ranged from 6.63±0.39 to 9.18±0.06 mmol L<sup>-1</sup> with mean 8.35 mmol L<sup>-1</sup>. The *trans*-resveratrol was detected in 57 out of 60 samples, which ranged from non-detectable to 16.4±0.04 mg L<sup>-1</sup> level (HPLC-PDA, LD=0.01 mg L<sup>-1</sup> and LQ=0.03 mg L<sup>-1</sup>). The Argentina wine samples (1,35 mg L<sup>-1</sup>) showed lower *trans*-resveratrol level than Bordeaux wine (3.33 mg L<sup>-1</sup>) (p<0,05). The Paraná wine showed higher brightness in relation to Argentinean wine, i.e., lighter color, however chroma and hue values did not differ statistically (p>0,05). The South-American wines showed interesting profile concerning high level of antioxidants in detriment to lower OTA contamination, which can provide benefit effect to human health. In addition, knowledge of *trans*-resveratrol interference in ic-ELISA will allow the use of excellent quality immunoreagent in nanotechnology.

**Key words:** Bordô wine. *Vitis vinifera*. Antioxidant. Chromatic parameter

### 5.2.1 Introdução

O vinho constitui fonte de uma variedade de flavonóides e não-flavonóides, compostos fenólicos antioxidantes benéficos à saúde. Entre os flavonóides destacam-se os flavonóis (quercetina, kaempferol e mirecetina), 3-flavanóis (catequina, epicatequina e taninos) e antocianina (cianina). Os não-flavonóides compreendem o estilbeno (resveratrol, viniferinas, *pterostilbene* e *piceatannol*), ácido hidroxicinâmico, ácido benzóico, ácido fenólico e álcool fenólico (MALACRIDA; & MOTTA, 2005; VEZZULLI *et al.*, 2007; DOPICO-GARCÍA *et al.*, 2008; ÁLEN-RUIZ *et al.*, 2009; LI; *et al.*, 2009). O resveratrol (RV) na uva constitui mecanismo de defesa em resposta à condição adversa, ataque de patogênico e estresse ambiental, sendo o nível particularmente alto na casca e semente (BAVARESCO *et al.*, 2003; YANG; MARTINSON; LIU, 2009; YANG *et al.*, 2009). A menor concentração de RV em vinho branco em relação ao tinto decorre da remoção de casca na fase anterior à fermentação (SAIKO *et al.*, 2008).

O composto fenólico contribui na característica organoléptica, em particular na cor e adstringência (MINUSSI *et al.*, 2003). Em paralelo, intercepta os aceleradores de envelhecimento e destruição celular, a exemplo de radicais livres gerados pelo metabolismo celular (respiração aeróbia, inflamação, peroxissomo), ou fontes exógenas (radiação gama e UV, fármaco, dieta, cigarro), além de quelar íons cobre e ferro, catalisadores de oxidação

lipídica (BIANCHI & ANTUNES, 1999; MINUSSI *et al.*, 2003; MAJO *et al.*, 2008; WELKE *et al.*, 2009).

Não obstante, o fator benefício de vinho deve ser assegurado, enfatizando-se a isenção de contaminantes indesejáveis desde o início da cadeia produtiva. Salienta-se o perigo da ocorrência de *Aspergillus* spp. ocratoxigênico entre grupo *Niger* na cadeia produtiva de uva, em particular, *Aspergillus niger* e *A. carbonarius*. Ocratoxina A (OTA), análogo primariamente nefrotóxico, também apresenta atividade mutagênica, genotóxica, hepatotóxica, imunossupressiva e possivelmente neurotóxica, sendo classificado como grupo 2B - carcinogênico a animais e possível carcinógeno ao homem (*International Agency for Research on Cancer - IARC*, 1993).

Embora o nível de contaminação em vinho seja baixo (0,01 a 0,24 ng mL<sup>-1</sup>), a ocorrência de OTA em países europeus tem sido alta (Quintela *et al.*, 2012). Por outro lado, o estudo sobre segurança microbiológica – micotoxinas em vinho consumido no Brasil ainda são insuficientes, e requer contribuição adicional (Shundo *et al.*, 2006).

Considerando que métodos clássicos para detecção de OTA incluem CLAE, CCD e imunoensaio, o estudo visa contribuir avaliando a aplicabilidade de ic-ELISA desenvolvido no monitoramento / segurança perante nível de OTA, aliado a análise de qualidade de vinho consumido (capacidade antioxidante, *trans*-resveratrol e parâmetros de cor) em vinho tinto argentino (*Vitis vinifera*) e paranaense (*Vitis labrusca*).

## 5.2.2 Material e Métodos

### 5.2.2.1 Material, reagente e equipamento

Material: microplaca 96 poços (Corning, EUA); coluna de inumoafinidade OchraTest (Vicom Inc., Watertown, EUA).

Reagente: OTA-BSA (albumina soro bovino) preparado por Doro da Silva (2010), segundo Kawamura *et al.* (1989); ovalbumina (OVA, Sigma, EUA); Anti-mouse IgG-peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA); 3,3',5,5'-tretametilbenzidina (TMB- Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA); peróxido de hidrogênio 30 % (Merck, Darmstadt, Alemanha); dimetilsulfóxido (DMSO -Trade TCI, Japão); acetonitrila, metanol e ácido acético grau HPLC (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, EUA); padrão de ocratoxina A (Sigma, Saint Louis, EUA); ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX, 97 %- Sigma,

Saint Louis, EUA); 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, radical livre (DPPH- Sigma, EUA); padrão de resveratrol (99% - Sigma, Saint Louis, EUA).

Equipamento: incubadora shaker (MA830/A, Marconi ® Laboratório); leitora de ELISA (Asys Expert Plus®, Biochrom, EUA); CLAE (Shimadzu, Japão); colorímetro (Chroma meter CR-400, Konica Minolta, Japão), CLAE-PDA (Alliance e-269, Waters, Milford, MA, EUA); espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, EUA).

#### 5.2.2.2 Vinho tinto

Um total 60 amostras de vinho tinto de diferentes procedências, pertencentes à safra 2009 e 2010, foram coletadas e armazenadas -12 °C até o momento de análise perante contaminação por OTA, assim como capacidade antioxidante, *trans*-resveratrol e parâmetros cromáticos. As 26 amostras argentinas foram coletadas em Buenos Aires-Argentina, enquanto que 34 amostras de vinho da variedade Bordô, foram provenientes do Estado do Paraná, foram coletadas por extensionistas do Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER).

#### 5.2.2.3 Hibridoma linhagem OTA.1

O hibridoma produzido pelo Dr. Osamu Kawamura de *Kagawa University*, Japão foi cedido e transportado até o Brasil, reativadas e armazenadas a -185 °C.

#### 5.2.2.4 Cultivo de hibridoma OTA.1 e purificação de AcM anti-OTA

O hibridoma utilizado foi célula de linhagem OTA.1 secretora de anticorpo monoclonal (AcM - isotipo IgG<sub>1</sub> kappa) para OTA derivado de mieloma linhagem Sp2/0-Ag14 e célula esplênica de camundongo BALB/c produzido por Kawamura *et al.* (1989). O AcM anti-OTA tem atividade cruzada com OTC (63.1 %), OTB (0.63 %), OT $\alpha$  (0.06 %) e 4-hidroxi-OTA (1.19 %). O hibridoma armazenado em meio contendo soro fetal bovino (SFB) e dimetilsulfóxido (DMSO) em nitrogênio líquido (-185 °C) foi recuperado por descongelamento rápido em banho-maria a 37 °C, lavado com 9 mL de meio RPMI 1640 (Gibco Co., USA) acrescido de 1 mL de SFB a 37 °C e centrifugado (1400 xg, 3 min). Descartado o sobrenadante, as células foram avaliadas microscopicamente, e a viabilidade celular pós-congelamento calculada e expressa em porcentagem (HARLOW & LANE, 1988).

Em seguida, as células foram reativadas em meio RPMI com 40 % de SFB, 7 mmol L<sup>-1</sup> de glutamina, 2 g de bicarbonato de sódio, 2,3 g de HEPES e 1 mL de gamicina 80 mg, para estimular a recuperação do hibridoma congelado. O cultivo procedeu-se em microplaca de fundo chato com 24 poços (Corning, USA) e frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc, Denmark) a 37 °C (incubadora sob 5 % CO<sub>2</sub>, Forma Scientific, USA). Gradualmente reduziu-se a porcentagem de SFB até 10 %, seguido de adaptação gradual por adição de 15, 30, 50, 75 e 100 % de meio Hybridoma-Serum Free Medium (H-SFM) (Gibco Co., USA) suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina (Gibco Co., USA) (BRUCE *et al.*, 2002; Kawamura, informação pessoal). Após, o cultivo procedeu-se avaliação quanto à concentração protéica por método de Bradford (1976) e atividade anti-OTA por ELISA indireto (i-ELISA) (KAWAMURA; *et al.*, 1989). O sobrenadante de cultivo foi precipitado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 60 % de saturação e seguido de manutenção a -86 °C.

#### 5.2.2.5 Extração de OTA em vinho para determinação em ELISA competitivo indireto

Alíquotas de 5,0 mL de vinho foram extraídas conforme Flajs *et al.* (2009), adicionando 5,0 mL de HCl 1mol L<sup>-1</sup> e 5,0 mL de clorofórmio, seguido de 20 min/150 rpm em incubadora e centrifugada por 20 min/ 2.000 xg. O extrato clorofórmico foi lavado com 2,0 mL de bicarbonato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (2x) e a fase bicarbonatada acidificada com ácido fórmico até pH 2,0. Após extração com 2,0 mL de clorofórmio (2x), o extrato clorofórmico foi evaporado em banho-maria (40°C) sob fluxo de nitrogênio gasoso.

#### 5.2.2.6 Determinação de OTA em vinho por ELISA competitivo indireto

Determinação de OTA foi realizada segundo Kawamura *et al.* (1989), padronizado por Silva (2010). Microplaca foi revestida com 100 µL de OTA-BSA (77 ng/mL) em tampão carbonato-bicarbonato 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 9.6 e incubada por 18 h à 4° C. Após quatro lavagens com PBST 0.05 %, os poços foram bloqueados com 200 µL de solução de OVA 0.1% em PBS e a microplaca incubada por 4 h à 25 °C. Após quatro lavagens com PBST 0.05 %, foi adicionado 50 µL de OTA padrão ou vinho e 50 µL de AcM anti-OTA.1 (43 ng/mL) em PBST. Após incubação por 18 h a 4 °C a microplaca foi lavada quatro vezes com PBST e adicionada 100 µL de conjugado IgG-HRP (1:1000), incubado por 1 h à 25°C. Após seis lavagens com PBST, foi adicionado 100 µL de substrato cromógeno

tetrametilbenzidina, seguido de incubação a 20 min à 25 °C. A reação foi bloqueada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1mol L<sup>-1</sup> e realizada a leitura da absorvância em 450 nm. A média da absorvância foi calculada da medida em triplicata de cada concentração e o resultado expresso como porcentagem de ligação pela Equação (1):

$$\% \text{ de ligação} = (A^+/A^-) \times 100 \quad (1)$$

Sendo A<sup>+</sup> a absorvância na presença de amostra ou OTA (padrão) e A<sup>-</sup> a absorvância na ausência de OTA. A concentração de OTA nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de OTA (0,1 a 10 ng OTA/mL), pela plotagem da porcentagem de ligação contra o log da concentração de OTA.

#### 5.2.2.7 Extração de OTA em coluna de imunoafinidade para determinação em CLAE

A extração de vinho tinto foi realizada de acordo com o manual da Vicam, sendo 10,0 mL de vinho adicionados de 10,0 mL da solução 1% Polietilenoglicol + 5% NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3. A mistura foi agitada e filtrada em filtro de vidro. Em seguida, 10,0 mL da mistura foi passada lentamente pela coluna de imunoafinidade (CIA). A CIA foi lavada com 5,0 mL da solução 2,5% NaCl + 0,5% NaHCO<sub>3</sub> e em seguida com 5,0 mL de água ultra-pura. OTA foi eluída com 2,0 mL de metanol e o eluato seco sob N<sub>2</sub>.

##### 5.2.2.7.1 Determinação de OTA por cromatografia líquida de alta eficiência

A análise de OTA foi realizada conforme o descrito por Pittet *et al.* (1996). O resíduo do eluato seco em N<sub>2</sub> gasoso foi dissolvido em acetonitrila-água (1:1, 1 mL) e 20 µL injetados no sistema de CLAE (isocrático de fase reversa) (forno CTO- 10AS, bomba LC-10AT VP), coluna Nucleosil 100 C<sub>18</sub> (5 µm, 4 x 250 mm, Merck, Alemanha), detector de fluorescência RF-10AXL, Shimadzu, Japan). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 475 nm, respectivamente. A fase móvel composta de acetonitrila-água-ácido acético (99:99:2) pH 3,0 com vazão de 1,0 mL/min. A concentração de OTA foi determinada utilizando-se curva padrão confeccionada de 1,0 a 50,0 ng OTA/mL em acetonitrila-água (1:1).

#### 5.2.2.8 Determinação da capacidade antioxidante por método de DPPH

A CAO foi determinada por método de DPPH, tendo TROLOX como padrão de referência para seqüestro de radicais livres, de acordo com Brand-Williams *et al.* (1995) modificada.

A amostra de vinho foi diluída em metanol (1:10, Nuclear, Brasil), 100 µL adicionado a 2,9 mL de solução metanólica de radical livre-DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, Sigma, Saint Louis, EUA). A porcentagem de diminuição na leitura a 515 nm foi medida após 25 min (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, EUA). A atividade antioxidante foi calculada, utilizando a curva padrão de TROLOX (Sigma, Saint Louis, EUA) na faixa de concentração de 0,19 a 0,95 mmol L<sup>-1</sup>. A curva padrão foi confeccionada com absorvância lida após adição de 2,9 mL de DPPH a 515 nm, empregando cubeta de acrílico (12,5 x 12,5 x 45 mm, Plastibrand, Alemanha).

#### 5.2.2.9 Análise de resveratrol por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (CLAE- UV/VIS PDA)

O resveratrol foi quantificado de acordo com método de Souto *et al.* (2001) modificado por Wietchorek (2011). Aliquota de 5,0 mL de vinho filtrado (0,22 µm de porosidade, membrana com 80% nitrato da celulose e 20% éster, SeS®) foi diluído na proporção 1:5 na fase móvel, seguida da injeção de 20,0 µL e analisado por CLAE isocrático. O sistema cromatográfico consistiu de Alliance e-2695 (Waters, Milford, MA, EUA), composto por bomba quaternária com degaseificador, coluna C-18 (X-Terra®, 250 x 4,6 mm, 5,0 µm, Waters), injetor automático acoplado ao detector de arranjo de fotodiodo (UV/VIS PDA 2998) com varredura ajustada de 220 a 600 nm, selecionando o comprimento de onda em 306 nm para leitura. A fase móvel consistiu em acetonitrila: água (25:75, v/v) ajustado a pH 3,14 com ácido fórmico (pHmetro/ionmeter, Metrohm, Suíça). A eluição foi isocrática a 1,0 mL min<sup>-1</sup>, com a temperatura controlada em 4 °C para o injetor, e de 25 °C para a coluna, sendo a corrida de 30 min gerenciada pelo *software* Empower 2.0. A curva padrão foi confeccionada com 0,05 a 10,00 mg L<sup>-1</sup> de *trans*-resveratrol (99% - Sigma, Saint Louis, EUA).

### 5.2.2.9.1 Análise cromática

A amostra filtrada (fibra de vidro, 25 mm de diâmetro, Macherey-nagel, Alemanha) e ajustada a pH 3,6, foi analisada empregando iluminante D<sub>65</sub> e sistema de cor CIEL\*a\*b\*. Os valores de L\* (luminosidade, variando de 0=preto a 100=branco), a\* (vermelho-verde) e b\* (amarelo-azul) foram determinados diretamente pelo colorímetro (Chroma meter CR-400, Konica Minolta, Japão). O parâmetro C\* (croma) foi calculado pela Equação (2), sendo o valor de C\* proporcional à intensidade de cor. O valor de h (tonalidade cromática) foi calculado pela Equação (3), considerando que h= 0° representa o vermelho puro; h=90°, amarelo puro; h=180°, verde puro; e h=270°, azul puro (BORGES *et al.*, 2002).

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (2)$$

$$h = \arctan (b^*/a^*) \quad (3)$$

### 5.2.2.9.2 Análise estatística

A caracterização de vinho pela análise de capacidade ocratoxina A, antioxidante, *trans*-resveratrol e cor (L\*, C\*, h<sub>graus</sub>) foi realizada por Teste t-student (5 % de significância), e análise multivariada utilizando análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamentos (AA), considerando-se a distância euclidiana como coeficiente de semelhança. A análise foi realizada pelo software Statistic 7.0 versão (Stat Soft, Inc.).

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Determinação de Ocratoxina A

#### **Análise por CLAE**

A Tabela 3 apresenta os teores de OTA obtidos por CLAE em vinhos de Argentina (26 amostras) e do Paraná (34 amostras). Apenas uma amostra (3,85 %) da Argentina elaborada com Shiraz/Cabernet apresentou-se positiva (n° 18; 0,12±0,01 ng mL<sup>-1</sup>), mas em nível abaixo de 2 ng mL<sup>-1</sup> preconizado pela legislação brasileira e Comunidade Européia (ANN., *Comm. Europ.*, 2005; ANVISA, 2011).

Quintela *et al.* (2012) observaram alta ocorrência de contaminação, mas com baixo nível de OTA em países europeus, com positividade de 93 % na França (0,01 –

0,24 ng mL<sup>-1</sup>, com média 0,14), 100 % na Itália (0,05 – 0,07 ng mL<sup>-1</sup>, com média 0,06) e Espanha (0,06 – 0,138 ng mL<sup>-1</sup>, com média 0,10); e 50 % na Austrália (0,03-0,07 ng mL<sup>-1</sup>, com média 0,03). Rosa *et al.* (2004-a) avaliaram 22 amostras de vinho tinto adquiridos no comércio de Rio de Janeiro, com 30 % de amostra de Brasil com 35,36±7,05 ng L<sup>-1</sup>; 28,6 % de Argentina com 33,35±9,97 ng mL<sup>-1</sup> e 40 % de Chile com 49,5±29,98 ng mL<sup>-1</sup>.

Shundo *et al.* (2006), avaliando vinho tinto comercializado em São Paulo-SP, as amostras de Argentina e Uruguai apresentaram contaminação em 16,7 % e 33,3 %, respectivamente, mas em níveis <0,03 ng mL<sup>-1</sup> de OTA. Estes valores indicaram menor índice de contaminação em relação a amostras de França com 60 % de contaminação (0,20 – 0,29 ng mL<sup>-1</sup>) e 100 % em Itália (0,03 – 0,32 ng mL<sup>-1</sup>), Portugal (0,03 - 0,25 ng mL<sup>-1</sup>) e Espanha (0,07- 0,12 ng mL<sup>-1</sup>). Em relação a amostras brasileiras, as 22 amostras do Estado do Rio Grande do Sul apresentaram contaminação de 6,9 % (0,10 – 0,24 ng mL<sup>-1</sup>), enquanto sete amostras (100 %) de Vale do São Francisco apresentaram OTA (0,36 – 1,33 ng mL<sup>-1</sup>), podendo a diferença ser atribuídas ao cultivar, microbiota e/ou clima. Silva (2010) analisando 47 amostras de vinho tinto (41 nacionais e 6 internacionais), adquiridos em comércio local e vinícola do Estado do Paraná, oito nacionais apresentaram contaminação (0,14 a 0,41 ng mL<sup>-1</sup>), em relação a duas internacionais (0,33 e 0,99 ng mL<sup>-1</sup>), independentemente de origem sul-americana ou européia.

Rosa *et al.* (2002-b) analisando cultivar Malbec e Chardonnay em Medonza-Argentina isolaram somente *Aspergillus niger*, sendo 17 % produtores de OTA (32-77µg mL<sup>-1</sup>). As mesmas cultivares apresentaram diferentes *Aspergillus* spp. no Rio Grande do Sul-Brasil, sendo 30% de *A. niger* (26-96 µg mL<sup>-1</sup>), 25 % de *A. ochraceous* (18-234 µg mL<sup>-1</sup>) e 40 % de *A. carbonarius* (140-2900 µg mL<sup>-1</sup>). Embora estes autores indiquem o perigo da ocorrência de OTA em uva, a Tabela 1 apresenta baixa contaminação. O fato sugere que além de genética fúngica, fatores como cultivar, excesso de irrigação, danos, e processos de vinificação (maceração, duração e temperatura de fermentação) sejam determinantes na ocorrência de OTA no vinho (BATTILANI *et al.*, 2006; WELKE *et al.*, 2009; MECA *et al.*, 2010).

### **Análise por ic-ELISA**

A Tabela 3 ainda apresenta os resultados de OTA empregando ic-ELISA; pelo imunoenensaio, apenas uma amostra argentina elaborada com Cabernet Sauvignon (0,43±0,04 ng mL<sup>-1</sup>) e 10 paranaenses com Bordô (0,32±0,00 a 0,47±0,14 ng mL<sup>-1</sup>) apresentaram-se positivas. Salienta-se que a amostra nº 18 com positividade de 0,12±0,01 ng

mL<sup>-1</sup> de OTA por CLAE apresentou-se negativa pela análise por ic-ELISA. O fato se justifica pela maior sensibilidade de método CLAE (LQ= 0,07 ng.mL<sup>-1</sup>) em relação a ic-ELISA (0,32 ng.mL<sup>-1</sup>), portanto, o maior índice de positividade por imunoensaio seja devido a reação falso-positiva. Ozalan *et al.* (2011) alegaram maior sensibilidade de imunoensaio analisando aflatoxina B<sub>1</sub> em 38 amostras de pistache, com 16 positivas (>16 ng g<sup>-1</sup>) por ELISA, mas negativas por CLAE, embora a possibilidade de reação falso-positiva não seja descartada (ONO *et al.*, 2000; MEIRELLES *et al.*, 2006; LÚCIO *et al.*, 2007; FUJII *et al.*, 2007).

Salienta-se a correlação de análise por CLAE e ic-ELISA padronizados em nosso laboratório (Figura 21), com a correlação CLAE e ic-ELISA de  $r = 0,975$  (Silva, 2010), superior a  $r = 0,821$  em vinho tinto, obtido por Flajs *et al.* (2009).

Ainda assim, as matrizes alimentares podem interferir nas reações imunológicas do ELISA, i.e., interações inespecíficas de Ac a componentes alimentares ou bloqueio estérico da ligação entre Ac e analito, causando superestimação e falso-positividade (FUJII *et al.*, 2004). Flajs *et al.* (2009) obtiveram contaminação de 0,14 ng mL<sup>-1</sup> em vinho tinto analisado por ELISA, mas introduzindo a etapa de limpeza com CIA, reduziu a mesma para 0,08 ng mL<sup>-1</sup>.

Os resultados de ic-ELISA apresentados na Tabela 3 corresponderam a análise de vinho diluído a 1:10 em PBST:metanol (9:1; v/v), conforme otimizado por Silva (2010). Ono *et al.* (2000) e Fujii *et al.* (2007) minimizaram a interferência de matriz introduzindo etapa de diluição anteriormente a análise por ELISA. Thongrussame *et al.* (2008) avaliaram o efeito de metanol (0-40 %) em tampão PBS em diferentes matrizes (arroz, cevada, milho), empregado como diluente na análise zearalenona; a adição de até 10 % de metanol não afetou o resultado, mas 20 e 40 % de metanol reduziu absorvância de 70 e 50 %, respectivamente, indicando que solvente orgânico como metanol, acetonitrila e etanol podem prejudicar a interação Ac-analito. Todavia, a diluição implica na perda de sensibilidade (DOUCET *et al.*, 2009). Os autores substituíram a diluição pela adição de sal caotrópico (tiocianato de sódio ou cloreto de magnésio), aliada a ação sinérgica de dimetilsulfóxido para reduzir interferente no soro. A baixa concentração de sal caotrópico inibiu a interação inespecífica fraca, porém alta concentração deste afetou negativamente, aumentando a agregação entre os componentes de soro. Provavelmente este não seria justificativa em nossa matriz, considerando o baixo teor protéico de vinho, portanto a falsa positividade no resultado de ic-ELISA (Tabela 3) provavelmente decorreu de outros fatores interferentes presentes na matriz-vinho.

### 5.3.2 Capacidade Antioxidante, *Trans*-resveratrol e Análise Cromática de Vinho

A Tabela 4 mostra os níveis de CAO e *trans*-resveratrol em amostras de vinho argentino (safra 2009-2010) e paranaense (safra 2009-2011). O nível de CAO no vinho paranaense, elaborado com *V. labrusca* cultivar Bordô, variou de  $2,79 \pm 0,00$  a  $8,21 \pm 0,18$  mmol L<sup>-1</sup> (média, 4,57 mmol L<sup>-1</sup>), apresentou-se inferior ao vinho argentino com  $6,63 \pm 0,39$  a  $9,18 \pm 0,06$  mmol L<sup>-1</sup> (média, 8,35 mmol L<sup>-1</sup>), elaborado com *Vitis vinifera* cultivar Cabernet Sauvignon (média, 8,39 mmol L<sup>-1</sup>) e Malbec ( $7,73$  mmol L<sup>-1</sup>) ( $p < 0,05$ ).

A literatura também tem relatado maior nível de CAO em vinho elaborado com *Vitis vinifera* em relação à *V. labrusca*. Assim, o vinho paranaense elaborado com *V. labrusca* cultivar Isabel apresentou 2,6 a 4,3 mmol L<sup>-1</sup> de CAO (NIXDORF & HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010), em relação a *V. vinifera* cultivar Cabernet Sauvignon com  $7,7 \pm 0,3$  a  $16,6 \pm 0,4$  mmol L<sup>-1</sup> (KONDRASHOV *et al.*, 2009). Entretanto, o nível de CAO em vinho de Santa Catarina apresentou sequência decrescente de *V. vinifera* cultivar Cabernet sauvignon ( $505,52 \pm 4,62$  µmol/g), de Merlot ( $328,39 \pm 3,15$  µmol/g), mas *V. labrusca* cultivar Bordô ( $361,12 \pm 2,89$  µmol/g) e Isabel ( $188,02 \pm 2,50$  µmol/g) (ROCKENBACH *et al.*, 2011). O fato indica que o teor de polifenol ativo em vinho depende da variedade de uva, geologia, ambiente e técnica de processamento (WORARATPHOKA *et al.*, 2007).

Todas as 26 amostras argentinas continham *trans*-resveratrol ( $0,72 \pm 0,08$  a  $4,56 \pm 0,08$  mg L<sup>-1</sup>, média 1,35 mg L<sup>-1</sup>), observando-se semelhança entre os que apresentaram maiores teores (Shiraz/Cabernet, 1,50 mg L<sup>-1</sup>; Cabernet Sauvignon, 1,48 mg L<sup>-1</sup> e Malbec, 1,47 mg L<sup>-1</sup>). Embora a positividade em vinho paranaense seja de 91,2 %, a média global de 3,33 mg L<sup>-1</sup> (faixa de n.d. a  $16,4 \pm 0,04$  mg L<sup>-1</sup>) indicou teor superior ao vinho argentino ( $p < 0,05$ ). Stervbo *et al.* (2007) concluíram que nível de resveratrol varia conforme o ano e região; nesta revisão, os autores mostraram maior nível de *trans*-resveratrol em Pinot noir ( $3,6 \pm 2,9$  mg L<sup>-1</sup>), seguida de St. Laurent ( $3,2 \pm 1,8$  mg L<sup>-1</sup>), Marzemino ( $3,0 \pm 2,1$  mg L<sup>-1</sup>), Merlot ( $2,8 \pm 2,6$  mg L<sup>-1</sup>), Blaufrankish ( $2,6 \pm 1,3$  mg L<sup>-1</sup>) e Cabernet Sauvignon ( $1,7 \pm 1,7$  mg L<sup>-1</sup>).

O nível significativamente elevado de *trans*-resveratrol em vinho paranaense (Tabela 4,  $p < 0,05$ ) poderia estar relacionado com a negatividade de OTA analisada por CLAE (Tabela 3), considerando a comprovada atividade anti-fúngica do composto. A adição de 30 µg g<sup>-1</sup> de *trans*-resveratrol no meio sintético inibiu o crescimento de *A. carbonarius* (BAVARESCO *et al.*, 2003). Avaliando o efeito de ácido caféico,

flavonóide, rutina e quercetina em *A. carbonarius*, o aumento de fenólicos inibiu a produção de OTA, com inibição completa de crescimento com 500 mg L<sup>-1</sup> (ROMERO *et al.*, 2009).

Todavia, Bavaresco *et al.* (2003) detectaram correlação positiva entre OTA e *trans*-resveratrol (estilbeno), assim como Perrone *et al.* (2007) analisando 112 amostras de vinho italiano detectaram correlação positiva entre o nível de OTA /estilbeno total ( $r= 0,74$ ) e, OTA/resveratrol ( $r= 0,50$ ) em vinho proveniente do sul da Itália. Os autores postularam que a infecção de fungo induziu a biossíntese de estilbeno na maturação de uva. Além de compostos fenólicos, outros fatores como irradiação UV, ozônio, cloreto de alumínio, umidade e temperatura podem contribuir com o alto nível de *trans*-resveratrol (YANG *et al.*, 2009), somando-se ao efeito observado no nosso resultado (Tabela 2).

A Tabela 5 mostra os parâmetros cromáticos em amostras de vinho estudados. O vinho argentino apresentou L\* variando de 18,54±0,05 a 20,66±0,03 (média de 19,89); C\* de 2,16±0,03 -8,01±0,06 (5,45) e h<sub>graus</sub> de 11,19±0,37 -25,98±0,77 (14,84). O vinho elaborado com Cabernet Sauvignon apresentou maiores valores de L\*(20,66±0,03), C\* (8,01±0,06) e h<sub>graus</sub> (25,98±0,77), i.e., mais clara, cor mais intensa e tonalidade cromática mais próxima ao amarelo em relação a demais amostras de *V. vinifera*. O vinho paranaense apresentou L\* variando de 18,80±0,03-24,64±0,02 (20,72); C\* de 0,99±0,03 -19,22±0,38 (6,40) e h<sub>graus</sub> de 12,32±0,68-76,53±0,99 (18,50). Portanto, o vinho paranaense apresentou maior luminosidade se comparado ao argentino, i.e., cor mais clara, mas sem diferença expressiva no valor de croma e tonalidade cromática ( $p>0,05$ ).

### 5.3.3 Avaliação do conjunto de parâmetros por ACP: OTA por ic-ELISA, antioxidante e análise cromática de vinho

A investigação aprofundada de dados obtidos prosseguiu-se com análise de componentes principais – ACP, sendo a interpretação realizada por análise multivariada, visando avaliar a correlação existente entre os diferentes parâmetros analisados. A representação gráfica em duas dimensões (CP1 e CP2) e similaridade entre parâmetros consta os dados de OTA, capacidade antioxidante, *trans*-resveratrol, luminosidade (L\*), croma (C\*) e tonalidade cromática (h<sub>graus</sub>) em vinhos analisados (Figura 22 e 23).

A Figura 22 representa a distribuição global do total de 60 amostras de vinho, analisadas com relação a qualidade (anti-oxindantes e cor) e segurança alimentar (OTA). A Figura 3 direciona a avaliação centrada em impacto de componentes de qualidade analítica por imunoenensaio (34 amostras paranaenses, sob ponto de vista interferência de antioxidantes na reação imunoquímica entre OTA-AcM).

A avaliação representada na Figura 22, considerando o vinho de procedência argentina (26 amostras) e paranaense (34 amostras), mostra que a CP1 (34 %) e CP2 (29 %) explicaram 63 % da variância do conjunto de dados. As variáveis que apresentaram correlação com CP1 consistiram de OTA ( $r = -0,57$ ), *trans-resveratrol* ( $r = -0,44$ ),  $L^*$  ( $r = -0,78$ ),  $C^*$  ( $r = -0,49$ ) e CAO ( $r = 0,82$ ), enquanto que na CP2, obteve correlação de  $L^*$  ( $r = -0,33$ ),  $C^*$  ( $r = -0,71$ ), *trans-resveratrol* ( $r = 0,71$ ), OTA ( $r = 0,51$ ) e  $h_{\text{graus}}$  ( $r = 0,60$ ).

A Figura 22-b mostra a formação de quatro grupos distintos, delimitada em círculos, procedendo corte em distância de 4,8, conforme análise de agrupamentos (Figura 22-c). O primeiro grupo contém uma amostra (nº 33); o segundo grupo duas (nº 46 e 47); o terceiro grupo quatro (nº 49, 31, 35, 50); o quarto grupo com 53 amostras incluindo vinho paranaense e argentina indicou semelhança entre o vinho de mesa e fino. A análise de amostra nº 33 pela CP2 mostra influência de  $h_{\text{graus}}$ , representando vinho com tonalidade cromática aproximado para amarelo. Freitas (2006) correlacionou alto teor de composto fenólico com a tonalidade cromática vermelha, principalmente devido a presença de antocianina. Embora não-significativa, o vinho argentino tendeu à tonalidade cromática vermelha, indicando maior teor de composto fenólico-antocianina, e conseqüente menor valor de  $h_{\text{graus}}$ . A análise pela CP1 e CP2 de amostras nº 46 e 47 mostraram a influência do teor de *trans-resveratrol* na determinação de OTA por ic-ELISA, com correlação de  $r = 0,47$ ; as amostras nº 49, 31, 35 e 50 apresentaram influência de  $L^*$  e  $C^*$ , i.e., vinho mais claro com cor intensa. A correlação entre os parâmetros  $L^*$  e  $C^*$  na análise de amostra total e paranaense manteve-se próxima, com  $r = 0,52$  e  $r = 0,51$ , respectivamente (Tabela 6).

A Figura 22-a mostra uma correlação entre *trans-resveratrol* e OTA determinada por ic-ELISA. Considerando que este fator esteja relacionado ao maior número de reação falso-positiva entre vinho paranaense (Tabela 3) com maior teor de *trans-resveratrol* (Tabela 4), na etapa seguinte procedeu-se a ACP centrada em vinho paranaense (Figura 23).

Conforme Figura 23-a, CP1 (34 %) e CP2 (26 %) explicaram 60 % da variância do conjunto de dados. As variáveis que apresentaram correlação com CP1 foram CAO ( $r = -0,68$ ),  $h_{\text{graus}}$  ( $r = -0,51$ ),  $L^*$  ( $r = 0,72$ ) e  $C^*$  ( $r = 0,85$ ); para CP2, *trans-resveratrol* ( $r = -0,80$ ), OTA ( $r = -0,82$ ) e CAO ( $r = 0,36$ ).

A literatura tem correlacionado a capacidade antioxidante com o teor de fenóis total (POURMORAD *et al.*, 2006; HODZIC *et al.*, 2009; CANUTO *et al.*, 2010). Entretanto, o vinho Bordô apresentou a correlação CAO/*trans-resveratrol* de  $r = -0,09$ , portanto baixa correlação (Tabela 6), em contraste, a correlação CAO/ $L^*$  ( $r = -0,35$ ), CAO/ $C^*$  ( $r = -0,43$ ) e CAO/ $h_{\text{graus}}$  ( $r = 0,23$ ). Já na análise de amostra total apresentou, respectivamente,  $r = -0,31$ ;  $r = -0,50$ ;  $r = -0,33$  e  $r = -0,05$ , mostrando a contribuição de parâmetros cromáticos na correlação com CAO.

Portanto, a análise de ACP sugere ocorrência de antioxidantes pertencentes a outros grupos químicos no vinho, não detectado pela metodologia empregada neste trabalho. Barreto *et al.* (2009) mostraram a baixa capacidade antioxidante de carotenóide e ácido ascórbico analisada

por método de ABTS, indicando a influência de extração sobre diferentes compostos com atividade antioxidante. Provavelmente, a maior influência de  $h_{\text{graus}}$  na CAO foi devido a extração de antocianinas analisada por método de DPPH. Na análise de amostra total,  $h_{\text{graus}}$  não correlacionou com CAO pela inclusão de amostra argentina contendo baixo valor de *trans*-resveratrol, alterando a relação de parâmetros analisados.

A CP2 (Figura 23-b) e análise de agrupamento (Figura 23-c) explicaram a influência de *trans*-resveratrol no resultado falso-positivo, perante contaminação por OTA analisada pelo ic-ELISA em 10 amostras paranaenses (nº 29, 33, 36, 39, 42, 43, 46, 47, 49 e 55). Flajs *et al.* (2009) detectaram provável interferência de antocianinas e pigmentos na ligação de OTA com Ac, resultando em reação falso-positivo. Em contraste, Ogunjimi *et al.* (1999) adicionando  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  de taninos condensados (protocianidinas com catequina, epicatequina, galato de epicatequina) em vinho tinto, inibiram a atividade de ligação de Ac em ELISA sanduíche. Assim, cuidados devem ser tomados quando proceder detecção de OTA por imunoenensaio em vinho contendo maior teor de antioxidante, em particular, o *trans*-resveratrol.

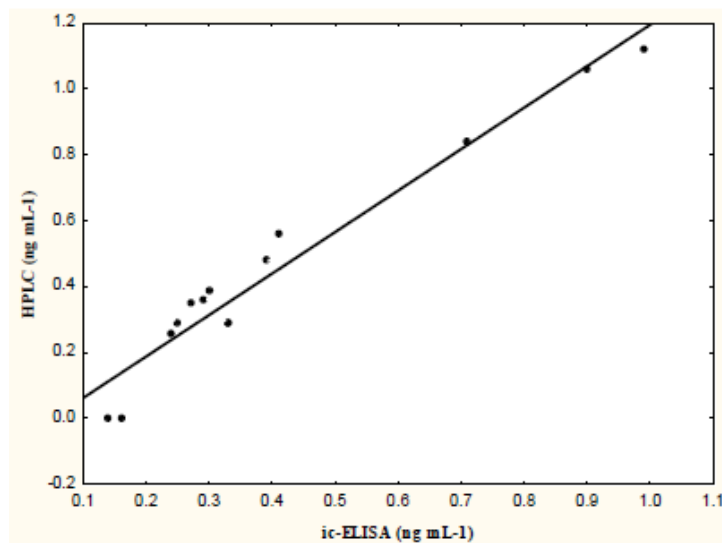
#### 5.4 CONCLUSÃO

O vinho paranaense e argentino preencheram o quesito adequado com a relação ao perfil de qualidade e segurança em relação ao nível de OTA, enquadrado na legislação brasileira e Comunidade Européia. Soma-se ainda, o alto nível de *trans*-resveratrol em vinho elaborado com *V. labrusca* paranaense, e capacidade antioxidante em vinho argentino elaborado com *V. vinifera*. Não obstante, a interferência de matriz, provavelmente relacionada ao nível de *trans*-resveratrol na detecção de OTA por ic-ELISA, requer aperfeiçoamento, se visar o desenvolvimento de nanoferramentas automatizadas.

#### **PS:**

Em anexo, Tabela 7 e 8 apresentam a numeração de vinho de Argentina e Paraná, respectivamente, empregadas nas análises de segurança e características de qualidade. E Tabela 9 apresenta comparação de custo na determinação de OTA por ic-ELISA e CLAE.

**Figura 21** – Correlação de CLAE e ic-ELISA para determinação de OTA em vinho tinto e branco (n=14)



Equação de regressão linear  $y=0,0642x + 12590$  e coeficiente de correlação de 0,975. O eixo x e y correspondem à concentração de OTA ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) determinada por ic-ELISA e CLAE, respectivamente.

Fonte: Silva (2010)

**Tabela 3** – OTA em vinho tinto argentino (safra 2009-2010) e paranaense (safra 2009-2011) analisado por CLAE e ic-ELISA.

País	Variedade	N	CLAE ( $\text{ng mL}^{-1}$ )			ic-ELISA ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) *		
			+	OTA	Média**	+	OTA	Média**
Argentina	Cabernet Sauvignon	18	-	n.d.	-	5,6	0,43±0,04	0,43
	Shiraz/Cabernet	1	100	0,12±0,01	0,12	-	n.d.	-
	Syrah/Cab. Sauvignon	1	-	n.d.	-	-	n.d.	-
	Malbec/Cab. Sauvignon	1	-	n.d.	-	-	n.d.	-
	Malbec	2	-	n.d.	-	-	n.d.	-
	Syrah	1	-	n.d.	-	-	n.d.	-
	Bonarda	1	-	n.d.	-	-	n.d.	-
	Merlot	1	-	n.d.	-	-	n.d.	-
	Tannat	1	-	n.d.	-	-	n.d.	-
	<b>Total</b>	<b>26</b>	3,85	n.d. - 0,12±0,01	-	3,85	n.d. - 0,43±0,04	-
Paranaense	Bordô	10	-	n.d.	-	100	0,32±0,02 - 0,47 ±0,14	0,37
		24	-	n.d.	-	-	n.d.	-
	<b>Total</b>	<b>34</b>	-	n.d.	-	29,4	n.d. - 0,47 ±0,14	-

(+): Amostra positiva.; \*: Análise executada em amostra diluída 1:10 ; \*\*: Média de amostras positivas; n.d.: não detectado / não quantificado

Ocratoxina A: CLAE → LD= 0,05  $\text{ng mL}^{-1}$ ; LQ=0,07  $\text{ng mL}^{-1}$  ; ic-ELISA → LD= 0,17  $\text{ng mL}^{-1}$ ; LQ=0,32  $\text{ng mL}^{-1}$

**Tabela 4** – Capacidade antioxidante e *trans*-resveratrol em vinho tinto argentino (safra 2009-2010) e paranaense (safra 2009-2011).

País	Variedade	N	CAO (mmol L <sup>-1</sup> )		<i>Trans</i> -resveratrol (mg L <sup>-1</sup> )				
			Varição	Média	+	Varição	Média		
Argentina	Cabernet Sauvignon	18	7,25 ±0,27	-9,18 ±0,06	8,39		0,72±0,08	-4,56±0,08	1,48
	Shiraz/Cabernet	1	8,16±0,12		8,16		0,81±0,04		0,81
	Syrah/Cab. Sauvignon	1	8,41±0,37		8,41		1,50±0,00		1,50
	Malbec/Cab.Sauvignon	1	8,41±0,18		8,41		0,96±0,00		0,96
	Malbec	2	6,63±0,39	-8,79 ±0,09	7,73	100	1,38±0,00	-1,56±0,00	1,47
	Syrah	1	8,11±0,22		8,11		0,75±0,04		0,75
	Bonarda	1	8,93±0,02		8,93		0,66±0,00		0,66
	Merlot	1	8,27±0,17		8,27		0,93±0,04		0,93
	Tannat	1	8,66±0,20		8,66		1,44±0,00		1,44
	<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>6,63±0,39</b>	<b>-9,18 ±0,06</b>	<b>8,35<sup>a</sup></b>		<b>0,72±0,08</b>	<b>-4,56±0,08</b>	<b>1,35<sup>b</sup></b>
Paranaense	Bordô	31				91,2	0,34±0,08	-16,4±0,04	3,66
		3				-	-	-	-
	<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>2,79±0,00</b>	<b>-8,21±0,18</b>	<b>4,57<sup>b</sup></b>		<b>n.d.</b>	<b>-16,4±0,04</b>	<b>3,33<sup>a</sup></b>

(+): amostra positiva.. n.d: não detectado /não quantificado; *Trans*-resveratrol: CLAE → LD= 0,01 mg L<sup>-1</sup> e LQ= 0,03 mg L<sup>-1</sup>.

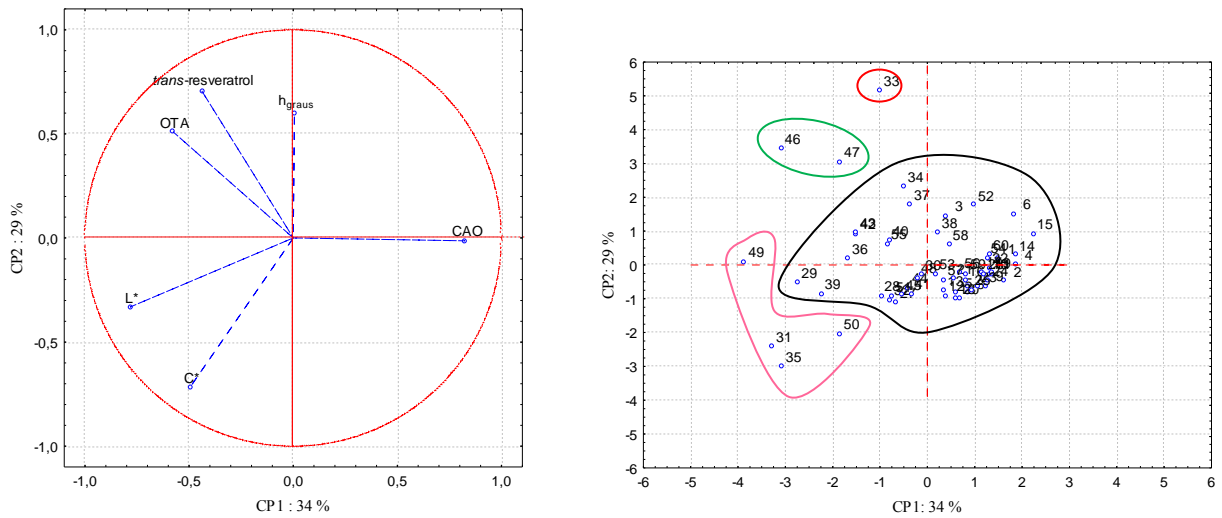
Letra diferente na mesma coluna representa diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

**Tabela 5** – Parâmetro cromático: luminosidade (L\*), cromia (C\*) e tonalidade cromática (h<sub>graus</sub>) em vinho tinto argentino (safra 2009-2010) e paranaense (safra 2009-2011).

País	Variedade	N	L*		C*		h <sub>graus</sub>				
			Varição	Média	Varição	Média	Varição	Média			
Argentina	Cabernet Sauvignon	18	18,54±0,05	-20,66±0,03	19,74	2,16±0,03	-8,01±0,06	5,30	11,19±0,37	-25,98±0,77	15,80
	Shiraz/Cabernet	1	20,55±0,01		20,55	7,75±1,10		7,75	13,12±2,00		13,12
	Syrah/Cab. Sauvignon	1	19,41±0,00		19,41	5,98±0,04		5,98	15,19±0,66		15,19
	Malbec/Cab. Sauvignon	1	20,57±0,01		20,57	7,36±0,08		7,36	11,53±0,61		11,53
	Malbec	2	20,15±0,12	-20,30±0,01	20,22	3,76±0,10	-4,90±0,03	4,33	12,40±0,10	-14,35±0,33	13,38
	Syrah	1	19,90±0,03		19,90	6,43±0,11		6,43	13,10±0,21		13,10
	Bonarda	1	20,20±0,16		20,20	4,80±0,80		4,80	13,11±1,38		13,11
	Merlot	1	20,26±0,01		20,26	6,17±0,07		6,17	11,37±0,40		11,37
	Tannat	1	20,17±0,04		20,17	4,36±0,04		4,36	13,14±0,74		13,14
	<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>18,54±0,05</b>	<b>-20,66±0,03</b>	<b>19,89<sup>a</sup></b>	<b>2,16±0,03</b>	<b>-8,01±0,06</b>	<b>5,45<sup>a</sup></b>	<b>11,19±0,37</b>	<b>-25,98±0,77</b>	<b>14,84<sup>a</sup></b>
Paranaense	Bordô	34	18,80±0,03	-24,64±0,02	20,72 <sup>a</sup>	0,99±0,03	-19,22±0,38	6,40 <sup>a</sup>	12,32±0,68	-76,53±0,99	18,50 <sup>a</sup>

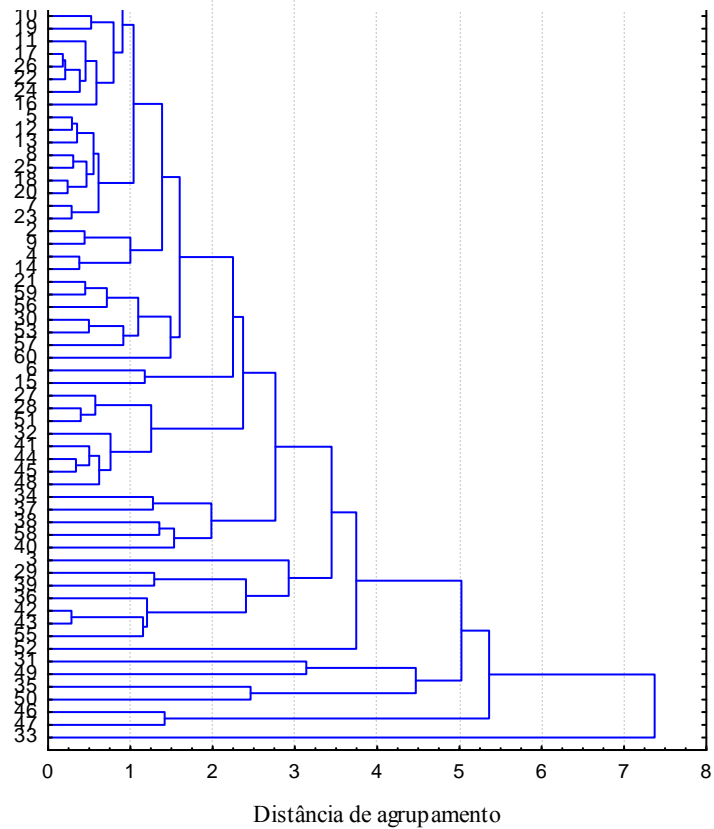
Letra diferente na mesma coluna apresenta diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

**Figura 22** – OTA, CAO, trans-resveratrol e parâmetros cromáticos: representação gráfica em duas dimensões (CP1 e CP2) envolvendo 26 amostras argentinas e 34 paranaenses.



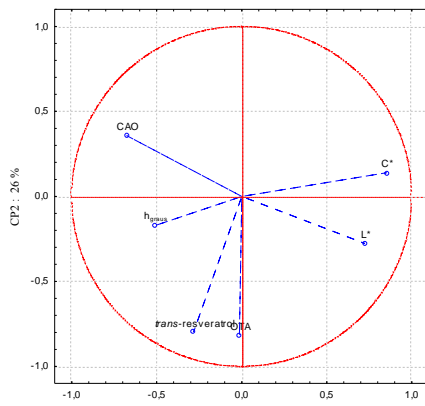
(a) Projeção de variável no plano.

(b) Projeção de amostra no plano.

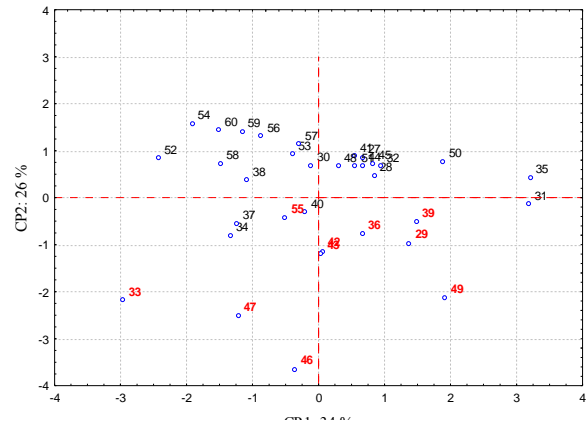


(c) Análise de agrupamento de amostra.

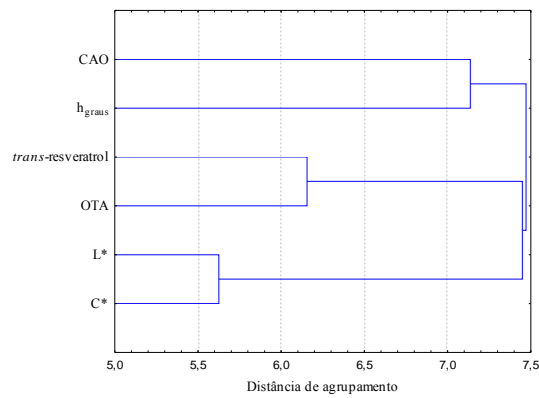
**Figura 23** – OTA, CAO, trans-resveratrol e parâmetros cromáticos: representação gráfica em duas dimensões (CP1 e CP2) envolvendo 34 amostras de vinho paranaense.



**(a)** Projecção de variável no plano.



**(b)** Projecção de amostra no plano. Os pontos destacados em vermelho correspondem a amostras positivas para OTA analisadas por ic-ELISA.



**(c)** Análise de agrupamento de parâmetros

**Tabela 6** –Correlação entre variáveis de vinho total e paranaense (safra 2009-2011).

Variável	Vinho argentino e paranaense					
	OTA	CAO	<i>Trans-resveratrol</i>	L*	C*	h <sub>graus</sub>
OTA	1,00	-0,33	0,47	0,21	-0,05	0,13
CAO	-0,33	1,00	-0,31	-0,50	-0,33	-0,05
<i>Trans-resveratrol</i>	0,47	-0,31	1,00	0,10	-0,27	0,22
L*	0,21	-0,50	0,10	1,00	0,51	-0,11
C*	-0,05	-0,33	-0,27	0,51	1,00	-0,26
h <sub>graus</sub>	0,13	-0,05	0,22	-0,11	-0,26	1,00
	Vinho paranaense					
OTA	1,00	-0,16	0,43	0,16	-0,09	0,08
CAO	-0,16	1,00	-0,09	-0,35	-0,43	0,23
<i>Trans-resveratrol</i>	0,43	-0,09	1,00	-0,00	-0,32	0,15
L*	0,16	-0,35	-0,00	1,00	0,52	-0,15
C*	-0,09	-0,43	-0,32	0,52	1,00	-0,26
h <sub>graus</sub>	0,08	0,23	0,15	-0,15	-0,26	1,00

## 6 CONCLUSÃO GERAL

O sucesso de cultivo de células Hibridoma OTA.1 exigiu cuidados críticos desde a etapa de reativação e expansão celular, controlando crescimento por meio de controle visual diário do tempo requerido para incubação em cada proporção de meio, confirmando a adaptação celular e prosseguimento para próxima etapa de cultivo. Detalhes minuciosos no pós cultivo constituíram fatores fundamentais na obtenção de AcM para confecção de CIA com melhor desempenho. Os estudos devem prosseguir para avaliar a aplicação da CIA produzida com AcM cultivado em 75 % de H-SFM em diferentes matrizes alimentares. Assim como o entendimento da relação de AcM aplicado em ic-ELISA para avaliação de segurança de vinho está intimamente ligada com os parâmetros de qualidade, em particular *trans-resveratrol*. O conhecimento de possível interferência de matriz na detecção de OTA em vinho por ic-ELISA requer aperfeiçoamento, necessário para prosseguir com desenvolvimento de novos métodos rápidos empregando imunoreagente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p.79-90, 2006.
- ÁLEN-RUIZ, F.; GARCÍA-FÁLCÓN, M.S.; PÉREZ-LAMELA, M.C.; MARTÍNEZ-CARBALLO; SIMAL-GÁNDARA. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. **Food Chemistry**, p.53-60, 2009.
- ALONSO-LOMILLO; M.A.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; FERREIRA-GONÇALVES, L.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. Sensitive enzyme-biosensor on screen-printed electrodes for ochratoxin A. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 1333-1337, 2010.
- AMEZQUETA, S.; GONZALEZ-PENAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M; CERAIN, A.L. Ochratoxin A decontamination: a review. **Food Control**, p.326-333, 2009.
- ANN., Jornal Oficial Das Comunidades Europeias. Regulamento (CE) nº472/2002 da Comissão de 12 de março de 2002 que altera o Regulamento (CE) nº 466/2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes, 2002.
- ANN., Jornal Oficial Das Comunidades Europeias. Regulamento (CE) nº123/2005 da Comissão de 26 de janeiro de 2005 que altera o Regulamento(CE) nº 466/2001 no que diz à respeito de ocratoxina A, 2005.
- ANN., Jornal Oficial Das Comunidades Europeias. Regulamento (CE) nº4010/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. 2006.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em; <  
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home!/ut/p/c4/04\\_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B\\_AwN\\_Q\\_2CbEdFAL9EuZ0!/?WCM\\_POR\\_TLET=PC\\_7\\_CGAH47L0006BC0IG5N65QO0875\\_WCM&WCM\\_GLOBAL\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/anvisa/sala+de+imprensa/noticias/anvisa+estabelece+limites+para+presenca+de+micotoxinas+em+alimentos](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B_AwN_Q_2CbEdFAL9EuZ0!/?WCM_POR_TLET=PC_7_CGAH47L0006BC0IG5N65QO0875_WCM&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/anvisa/sala+de+imprensa/noticias/anvisa+estabelece+limites+para+presenca+de+micotoxinas+em+alimentos)>. Acesso em: 25 abril 2011.
- BACALONI, A.; CAVALIERE, C.; FABERI, A. Automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of ochratoxin A in wine and beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 5518-5525, 2005.
- BARANOWSKA, I.; BARCHANSKA, H.; ABUKNESHA, R.A.; PRICE, R.G.; STALMACH, A. ELISA and HPLC methods for atrazine and simazine determination in trophic chains samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, p.341-348, 2008.
- BARNA-VETRÓ, I.; SOLTI, L.; TÉREN, J. Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.44071-4074, 1996.

BARRETO, G.P.M.; BENASSI, M.T.; MERCADATNE, A.Z. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.20, n.10, p.1856-1861, 2009.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, p. S2-S4, 2006.

BAVARESCO, L.; VEZZULLI, S.; BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T. Effect of ochratoxin A-producing *Aspergilli* on stilbenic phytoalexin synthesis in grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.6151-6157, 2003.

BIANCHI, M. L. P., ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, p. 123-130, 1999.

BIO-RAD LABORATORIES. Disponível em: < [http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/affinity/Biorad\\_Aff\\_Gel.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/affinity/Biorad_Aff_Gel.pdf)>. Acesso: 2 maio de 2012.

BLUMENTHAL, C.Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, p. 214-228, 2004.

BORGES, M.L.A.; FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.; GLÓRIA, M.B.A. Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torra em diferentes condições de aquecimento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Especial Café. Viçosa, n.5; p.3-8, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity Lebensmittel –**Wissenschaft & Technologie**. p. 5-30, 1995.

BRUCE M.P., BOYD V., DUCH C., WHITE J.R. Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies – alternatives to ascites production in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 264, p. 59-68, 2002.

CABAÑES, F.J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CASTELLA, G.; MÍNGUEZ, S.; PONS, A. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, p. 2113-2135, 2002.

CAMARGO, U.A. Uvas americanas e híbridadas para processamento em clima temperado. Embrapa uva e vinho. Jan 2003. Disponível em: [sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaCilmaTemperado/cultivar.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaCilmaTemperado/cultivar.htm)>. Acesso em: 27 dez 2011.

CAMARGO, U.A.; TONIETTO, J.; HOFFMAN, A. Progressos na vitivinicultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, p. 144-149, 2011.

CANUTO, G.A.; XAVIER, A.A.O.; NEVES, L.C.; BENASSI, M.T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.32, n.4, p.1196-1205, dez 2010.

CENTRE FOR FOOD SAFETY. Ochratoxin A in food, Hong Kong, nº 23, p. i-36, maio de 2006. Disponível em: < [http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme\\_rafs/files/cfs\\_news\\_ras\\_23\\_och.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/files/cfs_news_ras_23_och.pdf)>. Acesso em: 18 de dez 2011.

CHALFOUN, A.M.; BATISTA, L.R. **Fungos associados a frutos e grãos de café *Aspergillus & Penicillium***. Embrapa informação tecnológica, Brasília, 2003.

CHEN, B.; BAUTISTA, R.; YU, K.; ZAPATA, G.A.; MULKERRIN, M.G.; CHAMOW, S.M. Influence of histidine on the stability and physical properties of a fully human antibody in aqueous and solid forms. **Pharmaceutical Research**, v.20, n. 12, p. 1952-1960, dez 2003.

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

CONROY, P.J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R.J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in cell & Developmental Biology**, p.10-26, 2009.

DOPICO-GARCÍA, M.S.; FIQUE, A.; GUERRA, L.; AFONSO, J.M.; PEREIRA, P.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M. Principal components of phenolics to characterized red *Vinho Verde* grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds. **Talanta**, p. 1190-1202, 2008.

DOUCET, J.; CANAD, J.; KHALIS, C.; VALENTIN, M.-A.; MARRONY, S.; SECKERT-SALVA, F.; LEGAY, F.; AVRAMEAS, A. Reduction of matrix interferences by combination of chaotropic salt and DMSO in a broadly applicable target-based ELISA for pharmacokinetic studies of therapeutic monoclonal antibodies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p.924-931, 2009.

EMBRAPA. Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/cultivares.htm>>. Acesso em: 31 jul 2011.

ENNIS, J. The Munsell color notation, 2010. Disponível em: <<http://ennisart.blogspot.com/2010/11/munsell-color-notation.html>>. Acesso em: 27 de fev 2012.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, p.634-640, 2006.

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

FABIANI, A.; CORZANI, C.; ARFELLI, G. Correlation between different clean-up methods and analytical techniques performances to detect ochratoxin A in wine. **Talanta**, p.281-285, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, p.61-68, 1997.

FLAJS, D.; DOMIJAN, A.M.; IVIC, D.; CVJETKOVIC, B.; PERAICA, M. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. **Food Control**, p.590-592, 2009.

FREIRE; F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Embrapa Agroindústria, Fortaleza, out. 2007.

FREITAS. D.M. **Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinifera*) tintas em diferentes ambientes**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 663-671, 1999.

FRENETTE, C.; PAUGH, R.J.; TOZLOVANU, M.; JUZIO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R.A. Structure-activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites. **Analytica Chimica Acta**, p.153-161, 2008.

FUJII, S.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.2, p.273-292, jul/dez 2002.

FUJII, S.; GARCIA, L.B.; HIROOKA, E.Y. Metodologia imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. **Revista de Alimentos e Nutrição**., Araraquara, v.15, n.3, p.273-284, 2004.

FUJII, S.; ONO, E. Y. S.; RIBEIRO, R. M. R. ASSUNÇÃO, F. G. A. ; TAKABAYASHI, C. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ITANO, E. N.; UENO, Y.; KAWAMURA, O. ; HIROOKA, E. Y. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives of Biology Technology**. vol.50, no.2, p.349-359, 2007.

FUJII, S. **Métodos imunoquímicos para detecção de ocratoxina A, produção de imunorreagente e aplicação em diferentes matrizes alimentares**. 2007(b). Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V. Revisão: Ocratoxina A em café. **Brazilian Journal of Food Technology**. P.1-6, 1999.

FURTADO, R.F.; DUTRA, R.A.F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M.G.R.; GUEDES, M.I.G. **Análise de biosensores na análise da qualidade de alimentos**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2008.

GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; ATHANASOPOULOS,P.; KYRIAKIDIS, N.; GEROGIANNAKI, I.A.; SPANOS, M. *Trans*-resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. **Food Control**, p.700-706, 2006.

HAGE, D.S. Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, p.3-28, 1998.

HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p.245-281, 1988.

HEILMANN, K.; GROTH, T.; BEHRSING, O.; ALBRECHT, W.; SCHOSSIG, M.; LENDLEIN, A.; MICHEEL, B. The influence of the chemical composition of cell culture

material on the growth and antibody production of hybridoma cells. **Journal of Biotechnology**, p.291-301, 2005.

HODZIC, Z.; PASALIC, H.; MEMISEVIC, A.; SRABOVIC, M.; SALETOVIC, M.; POLJAKOVIC, M. The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extracts. **European Journal of Scientific Research**, v.28, n.3, p.471-477, 2009.

HUNTERLAB. CIEAL\*a\*b\* color scale, v. 8, n.7, p 1-4, 2008. Disponível em: < [www.hunterlab.com/appnotes/an07\\_96a.pdf](http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf)>. Acesso em: 22 de fev 2012.

IARC- Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Research on Cancer; Lyon, France, v. 56, p. 489-521, 1993.

IBRAVIN- Instituto Brasileiro do Vinho. A vitivinicultura Brasileira. Disponível em: < <http://www.ibravin.org.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 27 mar 2011.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org>>. Acesso: 15 dez 2010.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. Ed Printice Hall, Nova Jersey, 4 ed. 1998.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, p.342-362, 2007.

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

KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda, 2002.

KOHLER P.; AMEND, E.; SINGH, SK. Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation. **Biotechnology Progress**, p. 727-733, maio-jun 2010.

KONDO, F.; ITO, Y.; OKA, H.; YAMADA, S.; TSUJI, K.; IMOKAWA, M.; NIIMI, Y.; HARADA, K-I.; UENO, Y.; MIYAZAKI, Y. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. **Toxicon**, p.893-899, 2002(a).

KONDO, F.; MATSUMOTO, H.; YAMADA, S.; ISHIKAWA, N.; ITO, E.; NAGATA, S.; SUZUKI, M. HARADA, K-I. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. **Chemical Research in Toxicology**, p.1335-1359, 1996(b).

KONDRASHOV, A.; SEVCIK, R.; BENAKOVA, H.; KOSTIROVA, M. ; STIPEK, S. The key role of grape variety for antioxidant capacity of red wines. **e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, p.e41-e46, 2009.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K-H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2 edição, Ed. Thieme. 2005.

LEGAZPI, L.; D'IAZ, J.; LACA, A.; D'IAZ, M. Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free médium: substrate and agitation effects. **Biochemical Engineering Journal**, p.122-130, 2005.

LENZ, G. Métodos imunológicos, 2004. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/biofis/Bio10003 /MIMUNO.pdf](http://www.ufrgs.br/biofis/Bio10003/MIMUNO.pdf)>. Acesso em: 28 dez 2011.

LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, p.454-460, 2009.

LOUGHREY, K. Overview of color analysis. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, F5.1.1-F5.1.13, 2002.

LUCENA, A.P.S.; NASCIMENTO, R.J.B.; MACIEL, J.A.C.; TAVARES, J.X.; BARBOSA-FILHO, J.M. OLIVEIRA, E.J. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, p.30-35, 2010.

LÚCIO, C.H.; PINTO, N. F.J.; MARRIEL, I.E. Otimização do método de ELISA indireto não-competitivo para detecção e quantificação de aflatoxina B<sub>1</sub> em cereais. Comunicado técnico 152 -EMBRAPA. Minas Gerais, p.2-7; dez 2007.

LUONG, J.H.T.; MALE, K.B.; GLENNON, J.D. Biosensor technology: Technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, p.492-500, 2008.

LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, p.946-949, 2009.

MAHLER, H-C.; MULLER, R.; FRIEB, W.; DELILLE, A.; MATHEUS, S. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, p.407-417, 2005.

MAJO, D.; GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; NEVE, L.; GIAMMANCO, M. The oxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. **Food Chemistry**, p.45-49, 2008.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p. 659-664, out/dez 2005.

MARCOBAL, A.; POLO, M.C.; MARTIN-ALVAREZ, P.J.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Biogenic amine content of red wines: comparison of a direct ELISA and HPLC method for the determination of histamine in wines. **Food Research International**, p. 387-394, 2005.

MATEO, R.; MEDINA, A.; MATEO, E.M.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, p.79-83, 2007.

MAYER, G. Immunoglobulins – Structure and function. Carolina do Sul, Estados Unidos, 2009. Disponível em: <[pathmicro.med.sc.edu/Mayer/IgStruct2000.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/Mayer/IgStruct2000.htm)>. Acesso em: 28 dez 2011.

MCKINNEY, K.L.; DILWITZ, R.; BELFORT, G. Optimizing antibody production in batch hybridoma cell culture. **Journal of Biotechnology**, p.31-48, 1995.

MECA, G.; BLAIOTTRA, G.; RITIENI, A. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**, p. 579-583, 2010.

MEIRELLES, P.G.; BIAZON, L.; ONO, M.A.; HIRROKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Imunoensaios: uma alternativa para detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.4, p.617-628, out/dez 2006.

MELLO, L.M.R. Viticultura brasileira: panorama 2010. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: < <http://www.winesfrombrazil.com/admin/UPLarquivos/230320111340542.pdf>>. Acesso em: 26 mar 2011.

MINUSSI, R.C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G.M.; DURÁN. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, p. 409-416, 2003.

MORITZ, A.R. **Existe cor em nossas vidas**. Mundo da cor, 2011.

MOSER, A.C.; HAGE, D.S. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. **Bionalysis**, p.769-790, abril 2010.

MYCOBANK. Fungal Databases Nomenclature and Species Banks Online Taxonomic Novelties Submission. Disponível em;<[www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)>. Acesso em: 28 mar 2011.

NCBI. Immunology Provides Important Techniques Wich to Investigate Proteins. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22420/>>. Acesso em: 25 abril 2011.

NIXDORF, S.L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, p.208-215, 2010.

OGUNJIMI, A.A.; CHOUDARY, P.V. Adsorption of endogenous polyphenols relieves the inhibition by fruit juices and fresh produce of immune-PCR detection of Escherichia coli 0157:H7. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, p.213-220, 1999.

OIV- Organisation Internationale de La Vigne et Du Vin. OIV summary on the global situation of the wine and vine industry in 2009. Disponível em :< [http://news.reseau-concept.net/images/oiv\\_uk/Client/Communique\\_Stats\\_ilissi\\_EN.pdf](http://news.reseau-concept.net/images/oiv_uk/Client/Communique_Stats_ilissi_EN.pdf)>. Acesso em: 26 jul 2010.

ONO, E.Y.S.; KAWAMURA, O.; ONO, Y.O.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. A comparative study of Indirect Competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, p. 5-14, 2000.

OZASLAN, M.; CALISKAN, H.; KILIC, I.H.; KARAGOZ, I.D. Application of the ELISA and HPLC test for detection of aflatoxin in pistachio. **Scientific Research and Essays**, p.2913-2917, 18 jul 2011.

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M.H.; HASHIMOTO, J.M.; MENEZES, H.C. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.24-28, 2005.

PANDEY, S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, p.88-94, abr 2010.

PEDROSA, A.V.B.; DEZEN, R.B. O milho: características do mercado e perspectivas. **Preços agrícolas**, v.55, p.1-4, 1991.

PÉREZ-MARGAINÓ, S.; GONZÁLEZ-SANJOSE, M.L. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. **Food Chemistry**, p.301-306, 2003.

PERRONE, G.; NICOLETTI, I.; PASCALE, M.; ROSSI, A.; GIROLAMO, A.; VISCONTI, A., Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 6807-6812, 2007.

PETSKA, J.J.; ABOUZIED, M.N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxin in detection. **Food Technology**, Chicago, v.49, n.2, p. 102-107, 1995.

PIETRO-SIMÓN, B.; CAMPÀS, M.; MARTY, J.; NOGUER, T. Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples. **Biosensors and Bioelectronics**, p.995-1002, 2008.

PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A., VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column clean-up procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **44**, p.3564-3569, 1996.

POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR, S.J.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.1142-1145, jun 2006.

QUIAO, Y.; YANG, H.; WANG, B.; SONG, J.; DENG, A. Preparation and characterization of an immunoaffinity chromatography column for the selective extraction of trace contraceptive drug levonorgestrel from water samples. **Talanta**, p. 98-103, 2009.

QUINTELA, S.; VILLARÁN, M.C.; ARMENTIA, I.L.; ELEJALDE, E. Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. **Food Control**, p. 501-504, 2012.

RECEITA FEDERAL, Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Leis/2004/lei10970.htm>>. Acesso em: 15 de Nov de 2011.

RICARDO-DA-SILVA, J.; SOUSA, I.; LAUREAN, O. Fatores condicionantes dos processos de vinificação e conservação na cor de vinhos portugueses. X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 2003.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHENEIDER, Y.-J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemical-Biological Interactions**, p.18-46, 2006.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, A.E.S.S.; FETT, R. Phenolics compound content and antioxidant

activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, p. 174-179, 2011.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A.; GONZÁLEZ, J.P.; PÉREZ-TRUJILLO, F.J.; GARCÍA-MONTELONGO. Trans-resveratrol in wine from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, p.371-375, 2002.

ROLDÁN, A.; PALACIOS, V.; CARO, I.; PEAREZ, L. Resveratrol content of *Palomino fino* grapes: influence of vintage and fungal infection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.1464-1468, 2003.

ROMERO, S.M.; ALBERTO, M.R.; NADRA, M.C.M.; VAAMONDE, G. Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds. **Mycotoxin Research**, p.165-170, 2009.

ROSA, C.A.R.; PALACIOS, V.; COMBINA, M.; FRAGRA, M.E.; REKSON, A.O.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M. Potencial ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.4, p.408-414, 2002(b)

ROSA, C.A.R.; MAGNOLI, C.E.; FRAGA, M.E.; DALCERO, A.M.; SANTANA, D.M.N. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.21, n.4, p.358-364, abril 2004(a),

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Reviews in Mutation Research**, p. 68-94, 2008.

SAMSON, R. A.; REENEN-HOESKSTRA, E. S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food-and airborne fungi**. 7<sup>a</sup> ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C.A.; PENNA, N.G. HECKTHEUER, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p.437-442, jul-set 2005.

SELMA, M.V.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V.; AZNAR, R. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, p.126-134, 2008.

SENYUVA, H.Z.S.; GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. **Journal of Chromatography B**, p.115-132, 2010.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A.P.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; SAINDO, M. **Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil**. Brazilian Journal of Microbiology, p. 533-537, 2006.

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

SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M.H.; CONZ, A.; GOBBI, K.; Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of food Composition and Analysis**, n.4, v.14, p.441-445, 2001.

STAINES, D.; PRICE, P. **Managing serum requirements for cell culture**. GIBCO™ Cell Culture, abril 2003.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**, p.449-457, 2007.

SUGITA-KONISHI, Y.; TANAKA, T.; NAKAJIMA, M.; FUJITA, K.; NORIZUKI, H.; MOCHIZUKI, N.; TAKATORI, K. The comparison of two-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. **Talanta**, p.650-655, 2006.

TAKABAYASHI, C.R. **Imunoferramenta analítica: produção e desenvolvimento empregando hibridoma produtor de anticorpo monoclonal anti-aflatoxina**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

TECCHIO, F.M.; MIELE, A.; RIZZON, L.A. Características sensoriais do vinho Bordô. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.6, p.897-899, jun 2007.

THONGRUSSAME, T.; KUZMINA, N.S.; SHIM, W-B.; JIRATPONG, T.; EREMIN, S.A.; INTRASOOK, J.; CHUNG, D-H. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in cereals. **Food Additives and Contaminants**, v.25, n.8, p. 997-1006, ago 2008.

UVIBRA- União Brasileira de Vitivinicultura. Disponível em: < [http://www.uvibra.com.br/pdf/safra\\_uva1998-2010.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2010.pdf)>. Acesso em: 31 jul 2011.

VANKOVÁ R., GAUDINOVÁ A., SÜSSENBEKOVÁ H., DOBREV P., STRNAD M., HOLÍK J., LENFELD J. Comparison of oriented and random antibody immobilization in immunoaffinity chromatography of cytokinins. **Journal of Chromatography A**, v. 811, p. 77-84, 1998.

VEZZULLI, S.; BATTILANI, P.; BAVARESCO, L. Stilbene-synthase gene expression after *Aspergillus carbonarius* infection in grapes. **Am. J. Enol. Vitic.**, p.132-134, 2007.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. 2005. Especialização- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, p.89-101, 1999.

WANG, W.; SINGH, S.; ZENG, D.L.; KING, Z.; NEMA, S. Antibody structure, instability and formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, n. 1, p. 1-26, 2006.

WATANABE, E.; YOSHIMURA, Y.; YUASA, Y.; NAKAZAWA, H. Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits. **Analytica Chimica Acta**, p.199-206, 2001.

WELKE, J.E.; HOELTZ, M.; NOLL, I.B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.8, p.2567-2575, Nov 2009.

WEWETZER, K.; DILMAGHANI, K. Exposure to dimethyl sulfoxide at 37 °C prior to freezing significantly improves the recovery of cryopreserved hybridoma cells. **Cryobiology**, p. 288-292, 2001.

WIETCHOREK, Patrick Juliano Alves Gomes. **Resveratrol: validação de metodologia e quantificação em vinho da regiões oeste e sudoeste do Paraná**. 2011. 26 fls. Trabalho de Conclusão de Curso de Química Bacharelado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

WINES FROM BRAZIL. Disponível em: <<http://www.winesfrombrazil.com>>. Acesso em: 17 de jul de 2010.

WORARATPHOKA, J.; INTARAPICHET, K-O; INDRAPICHATE, K. Phenolic compounds and antioxidative properties of select wines from the northeast of Thailand. **Food Chemistry**, p.1485-1490, 2007.

YABE, M.J.S. **Determinação de metais pesados em águas superficiais por ICP-AES objetivando caracterização e recuperação de bacias hidrográficas**. 1995. Tese (Doutorado em Química Analítica). Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

YANG, J.; MARTINSON, T.E.; LIU, R.H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, p.332-339, 2009.

ZHENG, M.Z.; RICHARD, J.L.; BINDER, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia**, p.261-273, 2006.

**ANEXO**

**Tabela 7** –Ocratoxina A, capacidade antioxidante, *trans*-resveratrol e análise de cor em amostras de vinho tinto argentino, safra 2009-2010.

N°	Vinho tinto*			Ocratoxina A (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>		Antioxidante		Cor		
	Variedade	Local de produção (Região/Cidade)	Safra	CLAE	Ic-ELISA	CAO (mmol L <sup>-1</sup> )	<i>Trans</i> -resveratrol (g L <sup>-1</sup> )	L*	C*	<i>h<sub>gaw</sub></i>
1	Cabemet Sauvignon	Valle de afayate/Salta	2010	n.d.	n.d.	9,18±0,06	1,53±0,04	20,11±0,03	3,03±0,03	17,26±0,57
2	Cabemet Sauvignon	Cafayate/Salta	2010	n.d.	n.d.	8,65±0,02	0,72±0,08	18,94±0,05	7,05±0,15	14,04±0,46
3	Cabemet Sauvignon	Valle de Aminga/ La Rioja	2009	n.d.	0,43±0,04	8,78±0,03	2,70±0,00	19,41±0,01	3,92±0,04	16,06±0,51
4	Cabemet Sauvignon	San Juan	2010	n.d.	n.d.	8,62±0,20	0,63±0,04	18,99±0,02	4,51±0,06	16,63±0,33
5	Cabemet Sauvignon	San Juan	2010	n.d.	n.d.	7,68±0,01	1,11±0,04	20,39±0,05	7,20±0,02	13,17±0,33
6	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	9,00±0,10	4,56±0,08	18,97±0,01	2,16±0,03	25,98±0,77
7	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	7,79±0,32	0,90±0,00	20,10±0,02	6,56±0,01	14,53±0,40
8	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	8,54±0,14	0,90±0,00	20,56±0,04	6,24±0,05	11,19±0,37
9	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	8,07±0,39	0,93±0,04	19,16±0,02	8,01±0,06	14,41±0,82
10	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2009	n.d.	n.d.	9,10±0,04	2,01±0,04	19,81±0,01	5,83±0,02	14,39±0,41
11	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	8,68±0,11	0,90±0,08	19,88±0,01	4,91±0,06	15,40±0,78
12	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	7,25±0,27	0,93±0,04	20,50±0,02	7,75±0,05	13,88±0,17
13	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	7,43±0,35	1,62±0,00	20,66±0,03	7,00±0,02	12,74±0,30
14	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2009	n.d.	n.d.	8,77±0,21	1,71±0,04	18,88±0,09	4,36±0,09	17,37±0,42
15	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2009	n.d.	n.d.	8,70±0,16	1,20±0,00	18,54±0,05	2,65±0,08	25,06±0,80
16	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	7,90±0,12	1,41±0,04	20,46±0,10	5,01±0,08	12,50±0,24
17	Cabemet Sauvignon	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	8,51±0,15	1,38±0,08	20,26±0,01	3,96±0,04	13,92±0,44
18	Shiraz/Cabemet	Valle de Tulum/San Juan	2010	0,12±0,01	n.d.	8,16±0,12	0,81±0,04	20,55±0,01	7,75±1,10	13,12±2,00
19	Syrah/Cab. Sauvignon	San Juan	2010	n.d.	n.d.	8,41±0,37	1,50±0,00	19,41±0,00	5,98±0,04	15,19±0,66
20	Malbec/Cab. Sauvignon	Mendoza	2009	n.d.	n.d.	8,41±0,18	0,96±0,00	20,57±0,01	7,36±0,08	11,53±0,61
21	Malbec	Valle de pedernal/San Juan	2009	n.d.	n.d.	6,63±0,39	1,38±0,00	20,30±0,01	4,90±0,03	12,40±0,10
22	Malbec	Valle de Uco/Mendoza	2010	n.d.	n.d.	8,79±0,09	1,56±0,00	20,15±0,12	3,76±0,10	14,35±0,33
23	Syrah	San Juan	2010	n.d.	n.d.	8,11±0,22	0,75±0,04	19,90±0,03	6,43±0,11	13,10±0,21
24	Bonarda	San Juan	2010	n.d.	n.d.	8,93±0,02	0,66±0,00	20,20±0,16	4,80±0,80	13,11±1,38
25	Merlot	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	8,27±0,17	0,93±0,04	20,26±0,01	6,17±0,07	11,37±0,40
26	Tannat	Mendoza	2010	n.d.	n.d.	8,66±0,20	1,44±0,00	20,17±0,04	4,36±0,04	13,14±0,74

\*: coletado em julho/2011. - n.d: não detectado/não quantificado

Ocratoxina A: CLAE → LD= 0,05 ng mL<sup>-1</sup>; LQ=0,07 ng mL<sup>-1</sup>; Ic-ELISA → LD= 0,17 ng mL<sup>-1</sup>; LQ=0,32 ng mL<sup>-1</sup>. *Trans*-resveratrol: LD= 0,01 mg L<sup>-1</sup>; LQ= 0,03 mg L<sup>-1</sup>

**Tabela 8** –Ocratoxina A, capacidade antioxidante, *trans*-resveratrol e análise de cor em amostras de vinho tinto paranaense, variedade Bordô, safra 2009-2011.

N°	Vinho tinto*		Ocratoxina A (ng mL <sup>-1</sup> )		Antioxidante		Cor		
	Local de produção (Região/Cidade)	Safra	HPLC	Ic-ELISA	CAO (mmol L <sup>-1</sup> )	<i>Trans</i> -resveratrol (mg L <sup>-1</sup> )	L*	C*	$h_{\text{total}}$
27	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	4,47±0,00	1,27±0,00	20,69±0,18	9,37±0,06	14,67±0,33
28	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	3,92±0,00	2,84±0,03	20,75±0,07	9,32±0,04	13,26±0,08
29	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	0,32±0,00	4,66±0,00	4,28±0,07	21,95±0,01	12,79±0,01	15,99±0,04
30	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	4,60±0,02	2,27±0,00	20,37±0,21	4,96±0,03	12,31±0,68
31	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	2,97±0,03	1,33±0,00	24,64±0,02	11,56±0,04	13,30±0,05
32	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	3,36±0,02	0,80±0,00	20,70±0,08	8,10±0,04	13,60±0,26
33	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	0,38±0,00	4,99±0,00	6,61±0,07	20,29±0,06	0,99±0,03	76,53±0,99
34	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	4,12±0,03	9,11±0,01	20,19±0,01	1,70±0,02	30,33±0,48
35	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	3,63±0,01	1,18±0,00	23,18±0,03	18,85±0,01	18,36±0,15
36	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	0,32±0,02	3,64±0,00	2,41±0,03	20,79±0,02	7,06±0,02	12,86±0,26
37	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	4,75±0,00	9,74±0,04	19,81±0,00	3,28±0,00	20,07±0,12
38	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	4,86±0,02	3,96±0,04	19,97±0,08	2,59±0,05	22,50±0,26
39	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	0,32±0,03	3,96±0,01	0,96±0,00	21,60±0,35	11,03±0,10	13,80±0,43
40	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	4,05±0,02	6,44±0,02	20,95±0,12	3,41±0,08	15,92±0,85
41	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	3,65±0,02	n.d.	20,34±0,04	7,15±0,06	15,62±0,23
42	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	0,45±0,05	4,12±0,02	2,31±0,06	20,47±0,18	4,86±0,07	12,89±0,49
43	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	0,47±0,14	4,00±0,00	2,37±0,01	20,23±0,03	5,14±0,07	12,32±0,68
44	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	2,79±0,00	n.d.	20,29±0,03	5,70±0,08	14,36±0,10
45	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	n.d.	2,97±0,00	n.d.	20,44±0,01	6,70±0,07	13,72±0,30
46	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	0,42±0,01	3,02±0,01	16,4±0,04	20,60±0,03	4,09±0,02	14,09±0,38
47	Oeste/sudoeste	2009	n.d.	0,37±0,03	4,89±0,00	13,5±0,08	20,10±0,04	3,23±0,01	14,51±0,34

\*: \*coletado em julho/2011. (-): sem dados. - n.d.: não detectado /não quantificado

Ocratoxina A: CLAE → LD= 0,05 ng mL<sup>-1</sup>; LQ=0,07 ng mL<sup>-1</sup>; Ic-ELISA → LD= 0,17 ng mL<sup>-1</sup>; LQ=0,32 ng mL<sup>-1</sup>. *Trans*-resveratrol: LD= 0,01 mg L<sup>-1</sup>; LQ= 0,03 mg L<sup>-1</sup>

**Tabela 9** – Comparação de custo para determinação de OTA por ic-ELISA e CLAE.

Ic-ELISA		CLAE		
Etapas	Silva (2010)	Otimização*		
Sensibilização	R\$ 0,21	R\$ 0,21	CIA Ochratest®	R\$ 26,00
Bloqueio	R\$ 1,50	R\$ 1,50	Metanol grau HPLC	R\$ 1,15
Competição	R\$ 0,12	R\$ 0,20	Acetonitrila grau HPLC	R\$ 1,20
Anti-IgG-HRP	R\$ 4,05	R\$ 1,38		
TMB	R\$ 0,17	R\$ 0,17		
Solução Stop H2SO4 1M	R\$ 0,02	R\$ 0,02		
Lavagens	R\$ 1,40	R\$ 1,40		
Microplaca	R\$ 5,00	R\$ 5,00		
Tempo de análise	23h 30min	3h 30 min		2h50min
Custo	R\$12,50	R\$ 10,00		R\$ 28,35
Kit comercial				
Tempo de análise	45 min			
Custo	R\$ 1.000,00- 2.000,00			

\* Procedendo otimização com uso de anti-IgG-HRP mais diluído, por exemplo, seu custo reduziria R\$2,50.