



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CÁSSIA REIKA TAKABAYASHI

BIOFERRAMENTA ANALÍTICA:
PRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMPREGANDO
ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFLATOXINA
(HIBRIDOMA AF2 E AF4)

CÁSSIA REIKA TAKABAYASHI

BIOFERRAMENTA ANALÍTICA:
PRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMPREGANDO
ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFLATOXINA
(HIBRIDOMA AF2 E AF4)

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2009

CÁSSIA REIKA TAKABAYASHI

BIOFERRAMENTA ANALÍTICA:
PRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMPREGANDO
ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFLATOXINA
(HIBRIDOMA AF2 E AF4)

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono

Profa. Dra. Emilia Kiyomi Kuroda

Londrina, 27 de fevereiro de 2009.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia – Micotoxinas e Ficotoxinas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Centro de Ciências Agrárias) sob orientação da Profa Dra Elisa Yoko Hirooka, sob auxílio da Profa Dra Eiko Nakagawa Itano do Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Ciências Patológicas (Centro de Ciências Biológicas) da Universidade Estadual de Londrina. O apoio contou com Coodenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Projeto n. 47816/2007-0 do Edital MCT/CNPq nº 15/2007 Universal-Faixa C e Proj. nº 506334/2004-0 do Edital CT-Saúde/MCT/CNPq/MS n. 030/2004), Fundação Araucária (Proj. nº 04/2006, Protocolo (FUP) nº 9105), SETI/UGF Unidade Gestora do Fundo Paraná (CV. 33/04 Prot. nº 88, CP01/2004-Desenvolvimento Estratégico da Vigilância em Saúde) e PROPPG/UEL.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por sempre acreditar em mim e me
incentivar, mesmo estando longe.
Ao Henrique, por todo amor, compreensão e apoio.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela orientação, paciência, incentivo e valiosos ensinamentos, meus sinceros agradecimentos.

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

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro;

Ao CNPq e SETI-UFG-Fundo Paraná pelo apoio financeiro com os projetos;

Ao Dr. Osamu Kawamura de Kagawa University, Japão, pelo fornecimento de hibridoma AF2 e AF4, pela orientação e valiosas informações sobre produção de reagentes imunológicos, sem os quais este trabalho não seria possível;

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela valiosa orientação, auxílio no desenvolvimento técnico, utilização do laboratório de imunologia e empréstimo de materiais para confecção de coluna de imunoafinidade;

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela orientação, apoio e esclarecimentos de dúvidas no decorrer do trabalho;

À Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, Elza Youko Ida e Raúl J. H. Castro-Gómez, pela colaboração e empréstimo de materiais;

Ao prof. Dr. Mario Augusto Ono, pela colaboração tanto em permitir assistir as aulas de especialização, assim como pelo empréstimo de materiais para realizar eletroforese e a sua atenção;

Ao prof. Dr. Emerson José Venâncio, por permitir assistir a aula de especialização sobre assunto relacionado a anticorpo.

Ao prof. Dr. Dilson Ishikawa, pela sua ajuda, principalmente no uso do espectrofluorímetro;

Às futuras Doutoradas e amigas Joice Sifuentes dos Santos e Dani Luce Doro da Silva pelo apoio, colaboração, os momentos de descontrações e, sobretudo pelas suas amizades;

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

À Mestre Luciana Hayashi, que deu início a esse trabalho, pelas preciosas colaborações, prontidão em esclarecer dúvidas;

À amiga Tatiane Martins de Oliveira pelo auxílio prestado no cultivo de células, produção de anticorpos e demais experimentos, colaboração, alegria e amizade;

Aos estagiários Jayme de Toledo Piza e Almeida Filho, Waneska Gomes Franco, Ligia Manoel Martins, Máisa Almeida Leite, Diogo Gimenes Pedrollo e Igor Fernando Escanfelli da Silva pela colaboração, ajuda, apoio e alegrias;

À amiga Agnes Izumi Nagashima pela alegria, descontrações nos intervalos, companheirismo e amizade;

Aos colegas Cleiton Ramos, prof^a Dra. Emilia H. Kuroda e Luciana P. Bernd pelo precioso apoio, colaboração, dicas, companheirismo e, sobretudo, amizade;

Ao grupo de pesquisa, Angélica Tiemi Ishikawa, Thiago Montagner Souza, Leandro de Barros Ferrari, Wagner Ezequiel Rizzo, Carolina Nachi Rossi, Jaqueline Gozzi Bordini, Tatiana Ávila Miguel, Virgínia Carla de Almeida Falcão;

À Patrícia Sambatti, pela preciosa ajuda no laboratório, com reagentes, pedidos e favores, carinho e amizade;

A todos os funcionários e técnicos do Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nelson, Rubens, Célia, Irene, Alessandra, D. Marília, Sandra Rezende, Berenice e Elza Youssef, por me prestarem ajuda quando necessário;

Aos pós-graduandos e funcionários do Depto. Ciências Patológicas, em especial a Luciene Nagashima, Nilson, Mari, Tatiane e Jaqueline pela grande ajudam e colaboração;

Aos amigos e colegas, Luciana Lobato, Franciele Pelissari, Karla B. Guergoletto, Elisângela A. Ângelo, Andréia C. Santana, Leonardo R. Quintana, Fernanda Darpossolo, Tatiana Pimentel, Elvis P. Martins, Romilaine M. Nicolau Souza, Gislaine Silveira, Elenir L. Lobato, Danieli F. Zampieri, Lilian M. Pagamunici, Allan E Wilhelm, Gisele Nobre, Giselle Onuki, Marciane Magnani, Ana Paula Bilck, Iris L. Ziober, Luiz R. Morioka, Denis F. Marchi, Luciane Y. Yoshiara, Caroline M. Calliari, Michele Rosset, Cristiane Canan, Kérley Casari, pelo companheirismo, momentos de descontração e alegria, que suavizaram os dias árduos de trabalho;

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

AGRADECIMENTO PESSOAL

A Deus, por ter me dado a oportunidade de conviver com pessoas maravilhosas, sendo fundamental em minha vida e na concretização desta etapa;

Aos meus Pais, Hiromichi e Emilia Emiko Takabayashi, por todo incentivo, apoio, amor, dedicação e esforços realizados para minha formação profissional, apesar da distância sempre acreditaram em mim;

Ao André, Alyson e Maitê, meus queridos irmãos e cunhada, pelo apoio, carinho, compreensão, alegria dedicados a mim;

Ao meu sobrinho Kian, pelas alegrias e saudades que traz a minha vida;

Ao meu querido namorado Henrique Suizu Yamashita, pelo apoio, paciência, compreensão, força, carinho, amizade, amor e felicidade proporcionados a mim, servindo de estímulo para a concretização do mestrado, além das correções de português;

Aos meus futuros sogros e sua família, pelo apoio e receptividade a mim e a Alyson;

À Célia de Paulo Proêncio Ribeiro por ser meu apoio na casa, enquanto estava na universidade;

Ao meu amigo Eder Takeo Sato pelo apoio, principalmente para formatar computador e amizade nas idas e vindas a Bastos;

Aos meus queridos amigos e parentes, Ângela Cristina K. Loni, Cláudia Larissa S. Montanher, Natália Cristina S. de Lima, Paula Fernanda F. Artilha, Marco Antônio S. Volso, Alini B. Cardoso, Aline A. Marchette, Danilo Y. Enoki, Emerson, Eliza S. Utsunomiya, Francis M. Hayakawa, Letícia S. M de Souza, Natalino Ribeiro e Paula Camila Hayashi que tanto me deram força, apoio, carinho e amizade, dentro e fora da universidade.

TAKABAYASHI, C. R. **Bioferramenta analítica:** produção e desenvolvimento empregando anticorpo monoclonal antiaflatoxina (hibridoma AF2 e AF4). 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Aflatoxinas (AFs) constituem grupo de metabólitos secundários fúngicos de importância relevante na segurança de alimentos, com ênfase ao controle de aflatoxina B₁ em *commodities* da cadeia produtiva agropecuária. O monitoramento de micotoxinas em alimentos requer método analítico sensível, específico, exato, preciso e robusto. A análise quantitativa pode ser procedida por métodos químicos (CLAE, CCD, CG) e imunoquímicos (ELISA). A coluna de imunoafinidade (CIA) emprega anticorpo específico e, constitui método de escolha para a limpeza e concentração do analito. O estudo propôs cultivo de hibridoma linhagem AF2 e AF4 para produção de anticorpo monoclonal (AcM) *in vitro* em meio RPMI + 15 % de soro fetal bovino (SFB), assim como o mesmo meio com adição gradual de H-SFM (25, 50, 75 e 100 % H-SFM). A concentração proteica foi avaliada a 280 nm nas etapas de pós-cultivo, pós-precipitação com (NH₄)₂SO₄ e pós-diálise. A produção de AcM por hibridoma AF2 correspondeu à concentração média proteica de 2,94 mg/mL, enquanto que o hibridoma AF4 produziu 2,7 mg/mL. Embora AcM produzido pelo hibridoma AF4 apresente maior especificidade para AFB₁, para ensaios posteriores optou-se pelo hibridoma AF2, devido a facilidade no cultivo. Maior produção de AcM por AF2 ocorreu em cultivo contendo 50, 75 e 100 % H-SFM (eletroforese e i-ELISA em dialisado pós-precipitado com (NH₄)₂SO₄). Entre estes, o AcM produzido em 100 % de H-SFM (isento de SFB) e precipitado com saturação de 50 % de (NH₄)₂SO₄ apresentou menor teor de interferentes, sendo portanto, o procedimento indicado para obter Ac de qualidade destinado ao desenvolvimento de bioferramentas. O AcM produzido foi destinado ao desenvolvimento de ic-ELISA, que apresentou limite de detecção de 4,95 ng/g. Empregando este ic-ELISA, analisou-se AFB₁ em páprica (03), paçoca (02), pé de moleque (01) e milho (03), considerando que estas amostras sejam positivas em análise prévia realizada em Instituto Adolfo Lutz-SP (IAL), Kagawa University-JP (KUJ) e milho positivo pertencente ao monitoramento realizado no Norte do Paraná-BR. O resultado preliminar em amostra de milho A5 indicou nível de AFB₁ detectado por ic-ELISA desenvolvido (12,8 ng/g) semelhante ao valor obtido no IAL (19,2 ng/g). O mesmo pode ser inferido perante análise de milho B, uma amostra altamente contaminado perante ic-ELISA (310,66 ng/g), em relação ao valor detectado no KUJ empregando CIA-CLAE (333,04 ng/g) e coluna multifuncional-CLAE (296,45 ng/g). Contudo, principalmente nas amostras de páprica ocorreu reação falso-positivo com superestimação dos valores devido à intensa interferência de matriz, inviabilizando o uso do ic-ELISA desenvolvido para este grupo alimentar. Outrossim, para viabilizar a aplicação deste ic-ELISA ainda deve-se aperfeiçoar a etapa de extração e limpeza de extrato, assim como aumentar a sensibilidade. Paralelamente, introduziu-se a confecção de CIA empregando AcM produzido, sendo isso também o primeiro passo para o desafio visando montagem de imunobioferramentas da categoria de biosensores. A eficiência de acoplamento do AcM antiAFB₁ ao suporte Affi-Gel 10 variou de -8,03 a 80,61 %, indicando ser altamente promissor para prosseguir introduzindo a montagem de imunobiosensores. Ainda assim, deve-se prosseguir para a validação de CIA desenvolvida, assim como reutilização, capeamento e estabilidade visando suporte com alta especificidade, capaz de assegurar a qualidade de produto desenvolvido. A produção de AcM reduziria a dependência da importação de *kits* para análise de micotoxina e consequentemente, o custo da

análise no controle de qualidade, constituindo em técnica alternativa indispensável na triagem de aflatoxinas em matriz alimentar.

Palavras-chave: Aflatoxina. Hibridoma. Anticorpo monoclonal. Ic-ELISA e coluna de imunoafinidade.

TAKABAYASHI, C. R. **Biotechnological tool:** production and development using anti-aflatoxin monoclonal antibody (hybridoma AF2 and AF4). 2009. 95 f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Aflatoxins (AFs) are a group of secondary fungal metabolites of relevant importance in food safety, with emphasis on aflatoxin B₁ control in agricultural commodities in the productiveness chain. The monitoring of mycotoxin in food has to be performed using sensitive, specific, reliable, precise and robust analytical methods. The quantitative analysis can be carried out using chemical (HPLC, TLC, GC) and immunochemical methods (ELISA). The immunoaffinity column (CIA) prepared with specific antibody is the most suitable procedure to clean-up and concentrate the analyte. Purposed were the cultivation of hybridoma strain AF2 and AF4 aiming *in vitro* production of monoclonal antibody (mAb) in RPMI medium + 15 % fetal calf serum (SFB), as well as the same culture medium gradually added with increasing concentration of H-SFM (25, 50, 75 and 100 % H-SFM). The protein concentration in post-cultivation, post-precipitation with (NH₄)₂SO₄ and post-dialysis steps was monitored at 280 nm. The mAb produced by hybridoma AF2, which corresponded to the average of protein level was 2.94 mg/mL, whereas the hybridoma AF4 produced 2.7 mg/mL. Although the hybridoma AF4 provided highly specific anti-AFB₁ mAb, further assays were performed using hybridoma AF2, due to easier cultivation. Higher production of mAb by AF2 occurred in culture with 50, 75 and 100 % of H-SFM (demonstrated by i-ELISA and electrophoresis carried out in (NH₄)₂SO₄ post-precipitated dialysate). Among these, the mAb produced in 100 % of H-SFM (SFB-free), followed by precipitation with 50 % saturated (NH₄)₂SO₄ showed lower interferent bands. Therefore, this procedure should be recommended for antibody production aiming development of biotools. The ic-ELISA with detection limit of 4.95 ng/g was developed using this mAb, and it was applied to analyse AFB₁ in paprika (03), peanut derived product paçoca (02), pé-de-moleque (01) and corn (03). They were positive samples previously analysed in Instituto Adolfo Lutz, Sao Paulo (IAL), Kagawa University, JP (KUI); the aflatoxin positive corn belonged to the local monitoring sample in northern Paraná state-BR. The preliminary data of the corn sample A5 by ic-ELISA (12.8 ng/g) detected AFB₁ at similar level obtained in IAL (19.2 ng/g). The same inference could be deduced from highly contaminated maize B analysed by ic-ELISA (310.66 ng/g), when compared with CIA- HPLC (333.04 ng/g) and multicolumn-HPLC data (296.45 ng/g) performed in KUI. However, mainly the paprika samples showed false-positive reaction with overestimation due to intense matrix interference, disabling this ic-ELISA concerning analysis of such food group. Nevertheless, the application of ic-ELISA in development can be feasible if extraction and clean-up step, as well as the sensitivity were improved. Additionally, the manufacture of CIA prepared with mAb was challenged, which would be the first device in assembling immunobiotools of biosensor category. The coupling efficiency of anti-AFB₁ mAb in Affi-Gel 10 support ranged from -8.03 to 80.61 %, which point out a promising continuity of research through insertion of CIA as a device of immunobiosensor. Additional improvement, as well as the validation of prepared CIA, reuse, end-capping and stability aiming highly specific support, which can assure the quality of developed product is also topic in concern. The production of mAb enables the reduction of current dependence on importation of kits for mycotoxins analysis, and then the cost of analysis in food quality control, appointing as an essential alternative technique in aflatoxin screening in food matrix.

Keyword: Aflatoxin. Hybridoma. Monoclonal antibody. Ic-ELISA and immunoaffinity column.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura de principais aflatoxinas e metabólitos.....	21
Figura 2 -	Ativação de AFB ₁ e conjugação com proteína carreador.....	28
Figura 3 -	Esquema de ic-ELISA	29
Figura 4 -	Princípio da coluna de imunoafinidade.	31
Figura 5 –	Reativação, expansão e manutenção dos hibridomas AF2 e AF4 e produção de IgG antiAFB ₁ em meio sintético.....	35
Figura 6 –	Purificação, armazenamento e diálise de IgG antiAFB ₁	36
Figura 7 –	Extração de AFB ₁ em amostra de milho, páprica, paçoca e pé de moleque	37
Figura 8 –	Quantificação de AFB ₁ por ic-ELISA	38
Figura 9 –	Preparo da coluna de imunoafinidade utilizando suporte Affi-Gel 10 e IgG antiAFB ₁ produzido	39
Figura 10 -	Vista microscópica de células de hibridoma após descongelamento e saturação celular	52
Figura 11 –	SDS-PAGE de AcM anti-AFB ₁ produzido por hibridoma AF2 e AF4 em diferentes etapas de cultivo.....	54
Figura 12-	Determinação de atividade antiAFB ₁ por i-ELISA dos AcM produzidos por hibridoma AF2 e AF4.....	54
Figura 13 –	AcM precipitado com (NH ₄) ₂ SO ₄ para concentração e purificação parcial do AcM	55
Figura 14 –	Curva de ic-ELISA para confirmar o título de AcM (1:2000) comparando com título de AcM (1:200)	55
Figura 15 –	Avaliação da atividade de AcM antiAFB ₁ produzidos em meio de 50, 75 e 100 % H-SFM por ic-ELISA	56
Figura 16 –	Determinação da concentração ótima de AFB ₁ -BSA empregando i- ELISA.....	66
Figura 17 –	Determinação do título de AcM antiAFB ₁ e concentração de AFB ₁ - BSA empregando ic-ELISA	66
Figura 18 –	Curva padrão de ic-ELISA para AFB ₁	67
Figura 19 –	CCD de amostras de páprica, paçoca, pé-de-moleque e milho	67

Figura 20 –	Diluição de matriz alimentar visando redução da interferência na determinação de AFB ₁ por ic-ELISA.....	68
Figura 21 –	Esquema para confecção de CIA visando análise de AFB ₁ , diferenciando a concentração de AcM, temperatura de acoplamento, temperatura e tempo de bloqueio.....	80
Figura 22 –	CIA confeccionada com antiAFB ₁ acoplada a 0,5 ml de Affi-Gel 10	81
Figura 23 –	Esquema da confecção das CIAs.....	82
Figura 24 –	Visualização sob luz UV do CCD das principais fração de metanol eluído	84
Figura 25 –	Aspecto esbranquiçado e compacto do metanol eluído da CIA confeccionada	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reatividade cruzada de anticorpo monoclonal produzido por hibridoma AF4 e AF2 analisadas por ic-ELISA.....	43
Tabela 2 – Estimação de proteína e atividade antiAFB ₁ por hibridoma AF2 e AF4.....	53
Tabela 3 – Recuperação de AFB ₁ em matrizes alimentares contaminados artificialmente com solução de 20 ng AFB ₁ /g	68
Tabela 4 – Determinação de AFB ₁ em amostras de pápricas, paçocas, pé-de-moleque e milho por ic-ELISA.	69
Tabela 5 – Estudo comparativo interlaboratorial de determinaao de AFB ₁ em amostras de pé-de-moleque, paçocas, pápricas e milhos e acrescido de concetraao de AFB ₂	70
Tabela 6 - Eficiência do acoplamento de IgG antiAFB ₁ (%) ao Affi-Gel 10 em CIA confeccionada.	83
Tabela 7 - Teste de recuperaao de AFB ₁ com 10 ng/mL (3 mL) com CIA confeccionadas, quantificado por espectrofluorimetria (360-420 nm)	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	AFLATOXINAS	20
2.2	METODOLOGIA ANALÍTICA NA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS	24
2.3	IMUNOENSAIO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS	27
2.4	COLUNA DE IMUNOAFINIDADE	30
2.5	PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	MANUTENÇÃO DE HIBRIDOMA LINHAGEM AF2 E AF4 PARA PRODUÇÃO DE IGG ANTI AFB1	35
4.2	PURIFICAÇÃO DE IGG ANTI AFB1	36
4.3	EXTRAÇÃO DE AFB1 PARA ANÁLISE POR IC-ELISA	37
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE AFB1 POR IC-ELISA	38
4.5	CONFECCÃO DE COLUNA DE IMUNOAFINIDADE	39
5	CAPÍTULO I – ANTICORPO MONOCLONAL ANTI AFB1: PRODUÇÃO IN VITRO VISANDO DESENVOLVIMENTO DE BIOFERRAMENTAS	41
	MATERIAL E MÉTODOS	41
	MATERIAL	41
	LINHAGEM DE HIBRIDOMA	42
	CUTIVO DE HIBRIDOMA E PRODUÇÃO DE ACM ESPECÍFICO PARA AFLATOXINA	43
	MANUTENÇÃO E RECUPERAÇÃO DE HIBRIDOMA	43
	CONTAGEM E ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR	44
	PRODUÇÃO DE ACM IGG EM MEIO SINTÉTICO HYBRIDOMA-SFM	44
	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (IGG)	45
	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI AFB1 POR I-ELISA	45

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ANTICORPO MONOCLONAL IGG ANTIAFB1	46
PRECIPITAÇÃO COM (NH ₄) ₂ SO ₄	46
DIÁLISE DE PROTEÍNA	46
ELETROFORESE EM SDS-PAGE	46
IC-ELISA	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	51

6 CAPÍTULO II – IC-ELISA PARA AFLATOXINA UTILIZANDO ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFB1 PRODUZIDO POR HIBRIDOMA

AF	57
MATERIAL E MÉTODOS	57
AMOSTRAS	57
MATERIAL	57
EXTRAÇÃO DE AF NAS MATRIZES ALIMENTARES	58
ELISA COMPETITIVO INDIRETO.....	58
PADRONIZAÇÃO DE CONJUGADO AFB1-BSA	58
PADRONIZAÇÃO DE ANTICORPO	58
PREPARO DE SUBSTRATO TMB	59
PROCEDIMENTO.....	59
LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO IC-ELISA	60
ANÁLISE DE INTERFERENTES NO IC-ELISA.....	60
RECUPERAÇÃO DE AFB1 EM MATRIZES ALIMENTARES	60
CCD PARA ANÁLISE DE MATRIZES ALIMENTARES PARA SELEÇÃO DE CONTROLE NEGATIVO.	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
CONCLUSÃO	65

7 CAPÍTULO III – COLUNA DE IMUNOAFINIDADE DESENVOLVIDO COM AFFI-GEL 10 E ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFLATOXINA B1 COMO BIOFERRAMENTA VISANDO DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE AFLATOXINAS

MATERIAL E MÉTODOS	72
MATERIAL	72
CONFEÇÃO DE CIA PARA DETECÇÃO DE AFB1 EMPREGANDO ACM ANTIAFB1	73

PREPARAÇÃO DA CIA AFFI-GEL 10: ACOPLAMENTO AQUOSO.....	73
DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (IGG)	74
DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD	74
DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI AFB1	74
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO DE ACM À CIA AFFI-GEL 10	75
DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE AFB1 EM CIA AFFI-GEL 10	75
DETERMINAÇÃO DE AFB1 POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	76
DETERMINAÇÃO DE AFB1 POR ESPECTROFLUORIMETRIA	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui base econômica na agropecuária, sendo grande produtor e exportador, principalmente de grãos de soja, carne de frango e bovino. O Estado do Paraná se destaca como produtor de animais, especialmente de frango e será um dos maiores produtores de cereais, leguminosas e oleaginosas do país na safra de 2009, pelas estimativas do IBGE.

O conhecimento de que micotoxinas podem causar efeitos negativos a humanos e animais fizeram com que muitos países estabelecessem regulamentações a micotoxinas em alimentos e rações nas últimas décadas para proteger a saúde humana e os interesses econômicos dos produtores e comércio.

Dentro do grupo das micotoxinas, destaca-se aflatoxinas que são metabólitos secundários produzidas por um grupo de fungos, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*; sendo B₁, B₂, G₁ e G₂, os principais análogos estudados. Nos anos 60, tornou-se evidente que aflatoxinas representam significativa preocupação da saúde pública. Embora, a contaminação de fungos naturais como *Aspergillus*, não possa ser eliminada, exposição a toxinas pode ser minimizadas. Aflatoxina B₁ (AFB₁) é a toxina mais comum desse grupo, classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer no Grupo 1, carcinógeno ao humano.

Para monitorar a presença de micotoxinas em alimentos é necessário métodos de detecções analíticas que sejam sensíveis, específicos, exatos, precisos e robustos. Um método desejável além de ter essas características tem que ser de uso fácil, rápido e econômico.

A detecção de micotoxinas envolve a obtenção uma amostra adequada, preparação de amostra, e procedimentos analíticos. Amostra selecionada deve ser submetida à extração da toxina e limpeza para retirar interferentes. Posteriormente, o extrato limpo deve ser submetido a um sistema de detecção para determinar a presença ou quantificar a micotoxina na amostra. Os procedimentos para quantificação incluem cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), fluorimetria, cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS), testes baseados imunologicamente como imunoensaio enzimático (ELISA), sendo este considerado técnica alternativa atrativa e promissora para triagem de micotoxinas em alimentos. Os métodos devem ser validados para garantir que sejam funcionais e precisos.

A etapa de limpeza do extrato é crítico na determinação de micotoxinas. A utilização de anticorpos na coluna de imunoafinidade (CIA) tem se tornado popular devido a sua alta seletividade, capacidade de extração e remoção de interferentes.

Os anticorpos monoclonais (AcM) produzidos por hibridomas caracterizam-se pela alta especificidade, uniformidade e afinidade constante a um único epítipo, com produção contínua e em larga escala.

O desenvolvimento de ic-ELISA e CIA alia a disponibilidade de AcM antiAFB₁, o uso reduzido de solventes orgânicos e detecção rápida; visando minimizar o custo da análise no controle e segurança em alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AFLATOXINAS

A contaminação por micotoxinas é um assunto relevante na segurança de alimentos devido ao efeito tóxico, carcinogênico, teratogênico e imunossupressivo em humanos e animais (SAHA *et al.*, 2007; TAVČAR-KALCHER, *et al.*, 2007). Uma vez produzidas em condições específicas, estes metabólitos secundários persistem no armazenamento, assim como resistem ao processamento, constituindo num perigo natural de maior frequência na cadeia produtiva de alimento, já que o fungo constitui principal agente de doença em plantas (ANKLAM *et al.*, 2002; TAVČAR-KALCHER, *et al.*, 2007; MUSCARELLA *et al.*, 2007; GORYACHEVA *et al.*, 2007).

Dentre as micotoxinas, o grupo de aflatoxinas (AFs) produzido principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* destaca-se, não somente pela maior toxicidade, mas também pelo perigo de produção desde o estágio de campo, colheita, secagem, processamento e armazenagem. A contaminação e o acúmulo de AFs são afetados pelas condições ambientais, com ênfase à temperatura (25-30 °C) e alta umidade, associada à injúria causada por inseto e/ou mecânica (CARLSON *et al.*, 2000; JAIMEZ *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2008; DORNER, 2008).

A exposição humana a AFs preocupa a saúde pública, pela ampla possibilidade de ocorrência numa variedade de alimentos e plantas, envolvendo desde produtos de origem vegetal como cevada, milho, arroz, feijão, grãos de soja, castanhas, avelã, noz moscada, pistache, amendoim e derivados, farinha de trigo, figo, tamareira, pimenta, cerveja, sementes de algodão, copra, batata, sorgo, ervas medicinais, tabaco; a contaminação indireta através dos produtos de origem animal a exemplo do fígado, carne, leite, ovos e produtos derivados (JAIMEZ *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2004; EDINBORO; KARNES, 2005; XIULAN *et al.*, 2005; IP; CHE, 2006; CAVALIERE *et al.*, 2007; CALLERI *et al.*, 2007; MUSCARELLA *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2007; ARDIC *et al.*, 2008). Além de perigo à saúde, a contaminação por AFs afeta o valor econômico de culturas agrícolas, bem como reduz a eficiência na produção animal, aumentando o custo em todos os setores produtivos (SALAY; MERCADANTE, 2002; LEE *et al.*, 2004).

Existem mais de 20 análogos de AFs, sendo os principais B₁, B₂, G₁ e G₂ conforme ocorrência e patogenicidade. Os metabólitos derivados, resultante da biotransformação hepática de AFB, a exemplo de AFM₁ e AFM₂, são detectados em leite e outros fluidos orgânicos (Figura 1) (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

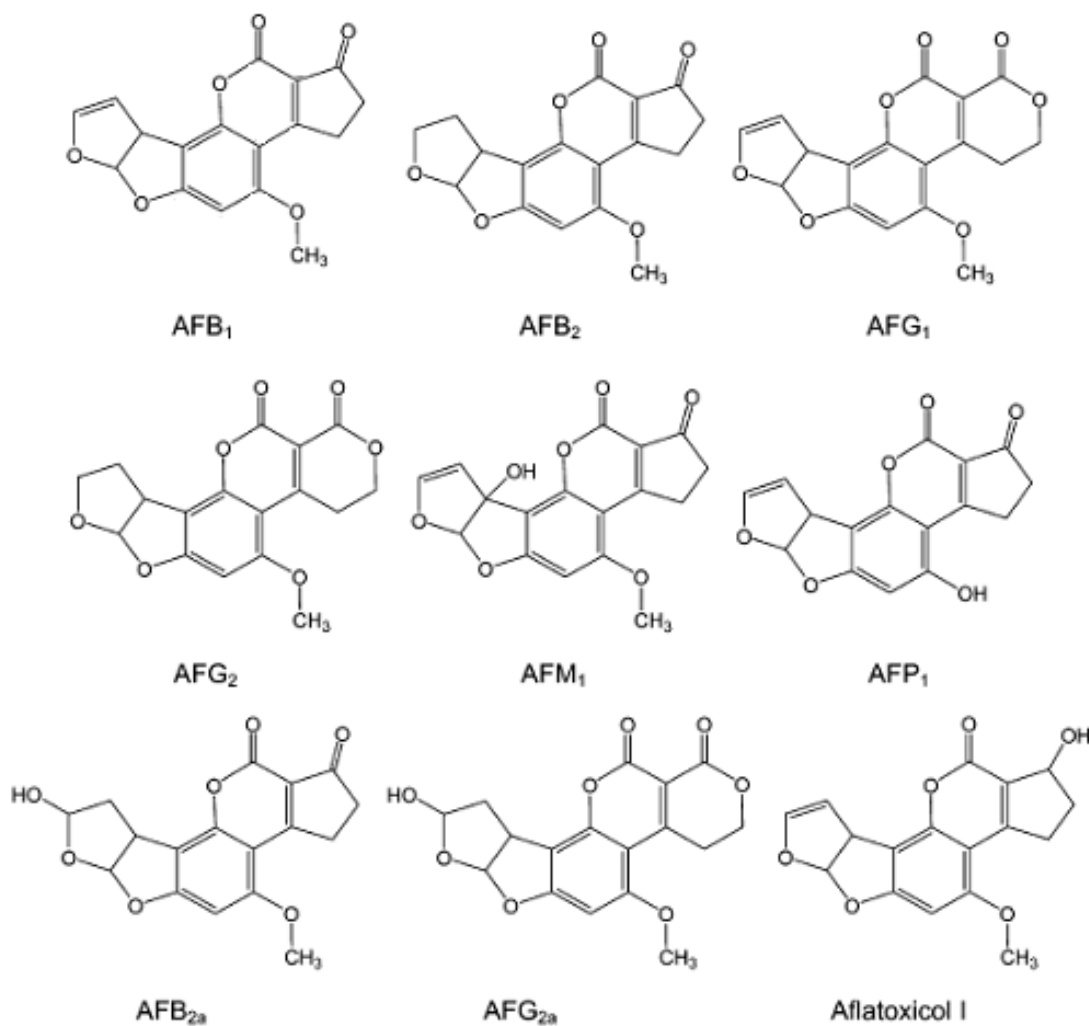


Figura 1 - Estrutura de principais aflatoxinas e metabólitos oriundos de biotransformação hepática (Fonte: LEE, *et al.*, 2004).

AFs são bisfurano cumarinas derivadas de decacetídeo, sintetizada pela via de policetídeos. A série G difere quimicamente da série B pela presença do anel 3-lactona, ao invés do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação entre carbono 8 e 9 ocorre como vinil éter no terminal de anel furano em AFB₁ e AFG₁, mas não em AFB₂ e AFG₂. Essa pequena

diferença estrutural afeta drasticamente a atividade, aumentando a carcinogenicidade e toxicidade de AFB₁ e AFG₁ em relação aos respectivos análogos AFB₂ e AFG₂ (JAIMEZ *et al.*, 2000).

A conjugação e rigidez estrutural de aflatoxina conferem característica natural de fluorescência, sendo que as denominações B e G decorrem de emissão em azul (*blue*, emissão cerca de 440 nm) e verde (*green*, a 460 nm), respectivamente, sob exposição à luz ultravioleta (360-365 nm). As pequenas variações estruturais têm influência drástica na propriedade fluorescente, permitindo a distinção visual das AFs, i.e. os análogos AFG₂ e AFB₂ fluorescem com maior intensidade do que homólogos insaturados AFB₁ e AFG₁ (JAIMEZ *et al.*, 2000; MARAGOS *et al.*, 2008).

A AFB₁ é a mais tóxica do grupo, classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002) no Grupo 1, i.e. carcinógeno ao humano. A toxicidade manifesta-se pela mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, dependendo da dose e tempo de exposição. Efeitos agudos causam danos estruturais e funcionais no fígado devido à necrose celular, hemorragia, lesões, fibrose e cirrose. Adicionalmente, desencadeiam imunossupressão, infecção no trato respiratório inferior, hemorragia gastrointestinal, indisposição e febre. Exposição crônica a AFs pode resultar em câncer hepático, bem como carcinomas em rim, pulmão, colon e sistema nervoso (COULOMBE, 1993; CARLSON *et al.*, 2000; JAIMEZ *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; EDINBORO; KARNES, 2005; BINDER *et al.*, 2007).

A susceptibilidade à AFs pode ser atribuída a fatores genéticos: espécie, sexo, raça e linhagem; fisiológicos: idade, nutrição, outras doenças, presença de outras toxinas e ambientais: clima, agricultura e tratamento (BRADBURN *et al.*, 1995; CARLSON *et al.*, 2000). Embora a susceptibilidade humana à AFs não esteja totalmente esclarecida, a alta incidência de carcinoma hepatocelular no sul da África, sudeste da Ásia, Coreia, Taiwan e China tem sido relacionado à dieta com elevado teor de AFs, combinada à infecção por vírus da hepatite B (SYLLA *et al.*, 1999; ANKLAM *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004; POLYCHRONAKI, *et al.*, 2008). Entre patogêneses associando ingestão de alimento contaminado com AFs citam-se a “cirrose infantil indiana”, parcialmente decorrente de intoxicação por AF e “Síndrome de Reye”, resultando em encefalopatia e degeneração lipídica de vísceras em criança (JAIMEZ *et al.*, 2000).

A biotransformação de AFB₁ é mediada principalmente pelo citocromo P450 microsomal intra e extra-hepática, embora haja outras conversões. A detoxicação hepática consiste em formação de metabólitos hidroxilados como AFM₁, AFQ₁, AFP₁, AFB_{2a}

(Figura 1) com potencial mutagênico inferior à AFB₁; em contraste, a ativação de AFB₁ gera AFB₁-8,9-epóxido altamente instável e reativo (COULOMBE, 1993; ORSI *et al.*, 2007).

A ação carcinogênica e mutagênica de AFB₁ decorre de alta afinidade eletrofílica e reatividade de AFB₁-8,9-epóxido a nucleófilos celulares como DNA, com ataque nucleofílico ao átomo N⁷ de guanina (GROOPMAN *et al.*, 1984; COULOMBE, 1993). Os indícios mostram que AFB₁ seja indutora de mutação no códon 249 em gene p53 supressor de tumor e, ocorre nas maioria das hepatocarcinomas (LEE *et al.*, 2004).

AFB₁-8,9-epóxido pode ser enzimaticamente inativada por glutathiona (GSH), sendo uma importante via de desintoxicação em várias espécies animais. Vias de conjugação com sulfato e ácido glicurônico também participam neste processo, sendo excretado através de urina (COULOMBE, 1993).

Aflatoxina M₁ (AFM₁) originada pela hidroxilação de AFB₁ em fígado animal corresponde a aproximadamente 1 a 3 % de AFB₁ ingerida e é conhecida como “toxina do leite” por ser a principal via de excreção, sendo eliminada dentro de algumas horas após a ingestão (ARAÚJO, 1990). AFM₁ é menos carcinogênico e mutagênico que AFB₁, mas com a toxicidade aguda similar a outras AFs. IARC classifica esta toxina no grupo 2B, i.e. possível carcinógeno ao humano (IARC, 2002). O perigo reside no caráter relativamente estável ao processo térmico de pasteurização e esterilização, mantendo-se durante o preparo e estocagem de produtos derivados (MUSCARELLA *et al.*, 2007). Em consideração à importância na dieta humana, principalmente na nutrição infantil, a AFM₁ em produtos lácteos tem sido motivo de preocupação à saúde pública perante segurança alimentar (CUCCI *et al.*, 2007; FINK-GREMMELS, 2008).

Agências governamentais têm estabelecido rigorosos programas para regulamentar os níveis de AFs permitidos em alimentos e rações, visando evitar exposição humana (AKIYAMA *et al.*, 2001; XIULAN *et al.*, 2006; VAN EGMOND *et al.*, 2007). O limite de tolerância para AFs varia conforme país importador ou exportador, blocos comerciais, bem como matrizes alimentares (ANKLAM *et al.*, 2002).

A Comunidade Europeia estabeleceu limite de 2 µg/kg para AFB₁ e 4 µg/kg para a soma de aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) em amendoim, nozes em geral, frutas secas e cereais. Para espécies de pimenta, decretou tolerância de AFB₁ em 5 µg/kg e, 10 µg/kg para AFs totais; 0,05 ng/L para AFM₁ no leite em geral, exceto leite para bebê e leite de transição (Regulamento (CE) 1881/2006, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA regulamentou o limite máximo tolerável de AF total (B₁+B₂+G₁+G₂) em 20 µg/kg para milho,

amendoim e derivados; 0,5 µg/L para AFB₁ em leite fluído; 5,0 µg/L para leite em pó (Resolução RDC 274, 2002).

2.2 METODOLOGIA ANALÍTICA NA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS

Detecção rápida de micotoxinas ou fungos produtores é um fator crucial no controle de qualidade e monitoramento, tendo em vista à necessidade do cumprimento de acordos comerciais e prevenção de perigo a saúde populacional (ANKLAM *et al.*, 2002). O monitoramento de AFB₁ em alimento e ração depende de métodos analíticos precisos e exatos, fato este confrontante em países em desenvolvimento, responsável pela produção de matéria-prima alimentar (XIULAN *et al.*, 2006; VAN EGMOND *et al.*, 2007).

A análise de micotoxinas geralmente segue etapas de amostragem, homogeneização, extração e limpeza-concentração de extrato (BERTHILLER *et al.*, 2007). Amostragem adequada é um ponto crucial para obter informação sobre níveis de contaminação, devido à distribuição heterogênea de contaminação. I.e., num lote normalmente ocorre baixa unidade de sementes contaminadas, porém estas apresentam níveis extremamente elevados de toxinas (VAN EGMOND *et al.*, 2007; DORNER, 2008; KRŠKA *et al.*, 2008).

A separação dos analitos de interesse é comumente alcançada por técnicas cromatográficas, seguida de detecção por métodos físico-químicos e imunoquímicos. A cromatografia tem como vantagem separar inúmeros analitos, enquanto que método imunoquímico utiliza anticorpos altamente específicos (BERTHILLER *et al.*, 2007).

Métodos analíticos tradicionais para a detecção de AFs empregam coluna cromatográfica, partição líquido-líquido, ou adsorção química para remover componentes interferentes. A quantificação é geralmente realizada após separação por cromatografia de camada delgada (CCD) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguida de detecção fluorimétrica (BRADBURN *et al.*, 1995, XIULAN *et al.*, 2006).

A CCD frequentemente destina-se à triagem de micotoxinas, devido à simplicidade e praticidade. O método é realizado em placas de sílica gel, sendo AFs detectadas por comparação do *spot* de amostras com padrão de toxinas sob luz UV (análise semiquantitativo), ou densitometria. No primeiro caso, a precisão e confiança dos resultados

dependem da habilidade e experiência do técnico (STROKA; ANKLAM, 2000, 2002; STROKA *et al.*, 2000).

CLAE é atualmente o método mais empregado para análise de micotoxinas, estando acoplado a várias estratégias de detecção (EDINBORO; KARNES, 2005). Na separação de AFs pode empregar tanto o sistema CLAE de fase normal ou reversa. Todavia, a fase reversa é mais frequente pela facilidade de manipulação, assim como menor toxicidade de fase móvel aquosa (JAIMEZ *et al.*, 2000; CALLERI *et al.*, 2007).

A propriedade fluorescente de AFs permite empregar sistema de detecção mais sensível e seletivo baseado em fluorescência. A principal inconveniência é a fluorescência de AFs (B₁,B₂,G₁,G₂) dependente da composição de solvente. Diferentes processos de derivatização têm sido testados, incluindo a derivatização pré-coluna com ácido trifluoroacético (TFA), ou derivatização pós-coluna com agentes como cloramina T, iodo e bromo ativos. Beta-ciclodextrina intensifica a fluorescência de anéis furanos insaturados de AFB₁, podendo ser utilizada como agente derivatizante pós-coluna, ou aditivo eluente em CLAE (JAIMEZ *et al.*, 2000; CALLERI *et al.*, 2007).

Embora a CLAE seja intensamente empregada, denota-se o aumento no uso de CCD através de alta performance (HPTLC) para análise de AFs. Embora a precisão de CCD seja inferior a CLAE, os dados obtidos por HPTLC são similares a CLAE e mais consistentes que ensaio ELISA (JAIMEZ *et al.*, 2000).

Cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC/MS) vem ocupando espaço entre métodos espectrométricos, sem necessidade de manipulação pós-coluna (EDINBORO; KARNES, 2005), além de aumentar a seletividade e sensibilidade (outrossim, detecção por fluorescência ainda tem sido mais sensível para AFs) (KRSKA *et al.*, 2008). A última geração de LC-MS/MS com ionização por *eletrospray* (ESI) permite análise de extrato bruto de planta sem limpeza prévia (BERTHILLER *et al.*, 2007).

CLAE-MS/MS permite detectar e quantificar os componentes polares sem derivatização. Outras vantagens incluem baixo limite de detecção, habilidade de gerar informações estruturais do analito exigindo mínimo tratamento da amostra, aliado a possibilidade de abranger diversos analitos de diferentes polaridades e exclui tendência de erro decorrente de derivatização e etapas de limpeza, diminuindo o tempo de análise. Espectrômetros de massas são detectores que não dependem somente das características químicas como absorvância em UV ou fluorescência. A desvantagem atual ainda está no custo elevado de análise (BERTHILLER *et al.*, 2007; KRSKA *et al.*, 2008).

A necessidade da implementação de novos métodos rápidos, compartilhando simplicidade com sensibilidade e precisão é evidente. No contexto, as bioferramentas tendem a compartilhar a alta especificidade de sistemas biológicos com a diversidade eletrônica, química e engenharia (TOMA, 2008).

A introdução de tecnologias emergentes em métodos rápidos para a detecção de resíduos tóxicos consiste principalmente de sistemas baseados em anticorpo (Ac). Os métodos imunquímicos surgiram como alternativa biotecnológica para minimizar o custo de análise, com destaque atual à coluna de imunoafinidade para limpeza. A advinda de biosensores destaca o Ac entre sensores que combina a atividade seletiva de elemento biológico sensível ao analito de interesse. O avanço introduziu novas modalidades de imunossensores eletroquímicos, imunensaio de fluorescência polarizada, *microarrays*, os quais empregam anticorpo monoclonal-AcM marcado com cromóforo fluorescente e imunossaios baseados em membranas como sondas *dipstick*, *flow-through assay* e *lateral flow test*. A química analítica isenta de solventes tóxicos e equipamentos sofisticados tem sido a meta do desenvolvimento de biotecnologia aplicada ao controle de resíduos, protegendo os analistas e evitando a contaminação ambiental. Estas biotecnologias emergentes para resíduos tóxicos dependem de anticorpos extremamente selecionados, assim como da produção irrestrita de AcMs (CARLSON *et al.*, 2000; DALY *et al.*, 2000; SCHNERR *et al.*, 2002; DELMULLE *et al.*, 2005; SAPSFORD *et al.*, 2006; KRKA *et al.*, 2008).

Xiulan *et al.* (2005 e 2006) desenvolveram a imunocromatografia capaz de acelerar o procedimento analítico, além de permitir realização de teste sem manejo de reagentes orgânicos altamente voláteis e tóxicos. Permitindo ensaio em uma etapa, não requeendo separação de anticorpo do complexo antígeno-anticorpo. A estimativa semiquantitativa é obtida através de quantificação por reação enzima-substrato.

Aparelhos promissores baseados em técnicas físicas não-destrutivas constituem outro sistema atraente, principalmente para o monitoramento em escala portuária e industrial, já que diferindo de métodos analíticos químicos, permitem disponibilizar ao mercado os produtos diretamente analisados perante perigo. Em nível de triagem, destaca-se as técnicas fundamentadas em método espectroscópico no infravermelho próximo ou médio, espectroscopia fotoacústica associada e infravermelho com transformada de Fourier; estes não determinam a própria toxina, mas indica probabilidade de contaminação no material analisado. Outrossim, deve-se salientar que a aplicação desse tipo de técnica é ainda limitada para triagem, devido à alta interferência dos componentes de matriz alimentar, além da disponibilidade reduzida de materiais certificados para calibração (ANKLAM *et al.*, 2002;

KOS *et al.*, 2002; MAIER *et al.*, 2004; KRŠKA *et al.*, 2008). Recentemente, Fernández-Ibañez *et al.* (2009) demonstraram o potencial uso de método espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) para rápida detecção de AFB₁ em cereais.

2.3 IMUNOENSAIO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS

Os imunoenaios constituem ferramentas bioanalíticas de abrangência universal, seja na área de ciências básicas como aplicada, sendo indispensável no diagnóstico clínico, cuja utilidade se estendeu para outras áreas como biotecnologia, ciência de alimentos, incluindo análise, microbiologia, nutrição, controle de qualidade e de processo (FUJII *et al.*, 2004).

Entre os métodos imunoquímicos, o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) se destaca entre os pioneiros na detecção rápida visando análise rotineiro de micotoxinas (ANKLAM *et al.*, 2002; CALLERI, 2007; XIULAN *et al.*, 2006). Diversos imunoenaios ELISA têm sido comercialmente disponibilizados para uma variedade de micotoxinas, incluindo detecção de aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol, citrinina e toxina T-2 (PITTET, 2005; KRŠKA *et al.*, 2008). Método de ELISA é uma alternativa simples e econômica a métodos instrumentais químicos em constante avanço, sendo indicado para a triagem rápida na análise de micotoxinas em matrizes alimentares (KOLOSOVA *et al.*, 2006; PRIETO-SIMÓN *et al.*, 2007).

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

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

Por exemplo, a AFB₁ requer introdução de grupo carboxílico para conjugação com moléculas carreadoras (Figura 2). Esse grupo pode ser ativado e liga-se covalentemente ao grupo amina de proteína para formar ligação amida estável. Primeiramente, AFB₁ é convertido a AFB₁-*O*-carboximetil-oxime (Afla B₁-oxime) (CHU; UENO, 1977); a seguir, diferentes conjugados AFB₁-proteína podem ser preparados reagindo AFB₁-oxime com albumina de soro bovino (BSA), ovalbumina (OVA), *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) e gama globulina bovino (BGG) (CHU; UENO, 1977; GROOPMAN *et al.*, 1984; HEUSSNER *et al.*, 2007). Assim como, AFB₁ pode ser conjugada com molécula carreadora, na posição da dupla ligação entre carbono 8 e 9 da molécula e por fim apresentar produção de anticorpo de afinidade diferente. A especificidade do anticorpo a ser produzido tem influência do hapteno usado para se tornar imunógeno e o método para conjugar o hapteno a molécula carreadora (FRUTOS, 1995).

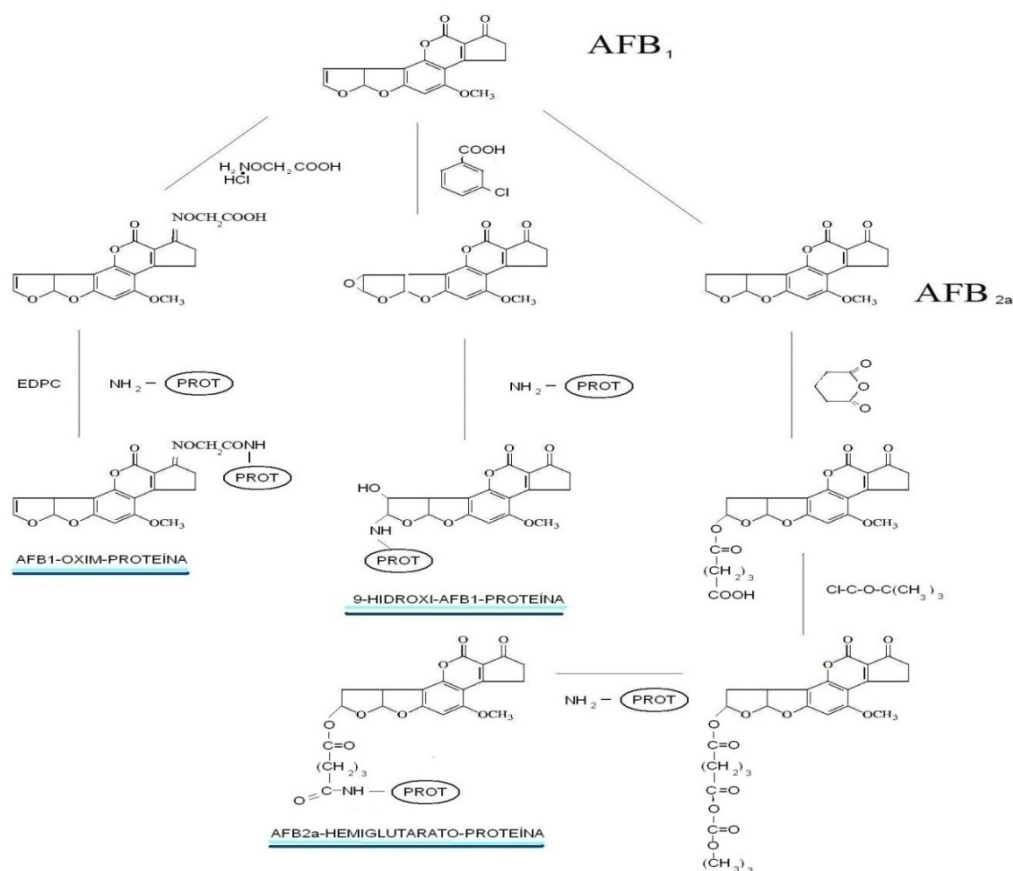


Figura 2 - Ativação de AFB₁ e conjugação com proteína carreadora (Fonte: UENO *et al.*, 1987).

Assim, a modalidade de ELISA indicada para proceder à determinação de micotoxinas seria o competitivo indireto (ic-ELISA), cujo protocolo de ensaio requer somente um Ac específico (FUJII *et al.*, 2004).

O princípio de ic-ELISA fundamenta-se na competição entre micotoxina presente na amostra com a toxina imobilizada na microplaca, perante o mesmo sítio específico do Ac. A concentração de toxina na amostra é indiretamente quantificada pela reação procedente de Ac específico antimicotoxina absorvido à superfície sensibilizada, que atua como sítio de ligação ao anti-IgG (Ac secundário) marcado com enzima, responsável pela reação colorimétrica (Figura 3).

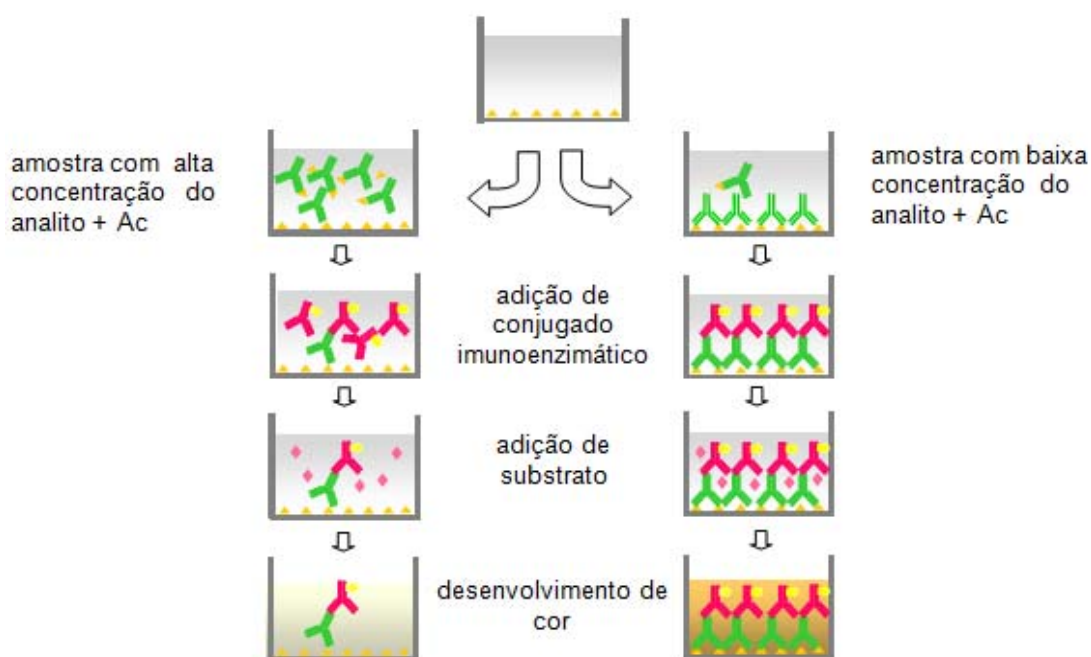


Figura 3 - Esquema de ic-ELISA (Fonte: ONO *et al.*, 2004).

As principais vantagens de imunoensaio são a especificidade na detecção - devido à seletividade de ligação anticorpo-antígeno, rapidez, simplicidade e adaptabilidade; sendo a reação realizada numa microplaca com capacidade de análise simultânea para dezenas de amostras (LEE *et al.*, 2004; SAHA *et al.*, 2007; KRŠKA *et al.*, 2008). Além disso, a maioria de protocolos não requer uma limpeza de amostras após diluição do extrato e/ou filtração antes da análise (PITTET, 2005).

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

2.4 COLUNA DE IMUNOAFINIDADE

A melhora na eficiência e sensibilidade de métodos tradicionais imunológicos e instrumentais, seja ELISA, CCD ou CLAE, requer preparo de amostras anteriormente às respectivas análises, i.e. fornecer extrato suficientemente limpo, capaz de permitir detecção e quantificação adequada do analito. O processo de extração empregando coluna de fase sólida preparado com suporte contendo sítios ativos de caráter químico (sílica gel, C-18, florisil, fenil, aminopropil, material de troca iônica tanto aniônico como catiônico) ou Acs (imunoafinidade), têm simplificado a etapa de limpeza e/ou concentração de analitos de interesse a partir de uma mistura complexa. O processo empregando Acs usa volume de solvente não clorado relativamente pequeno; permite a automação, sendo menos tóxico, reduzindo tempo de análise e aumentando o rendimento (BRADBURN *et al.*, 1995; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; FUJII *et al.*, 2004; XIULAN *et al.*, 2006; NICHOLAS *et al.*, 2009).

A atual tendência indica o uso da coluna de imunoafinidade (CIA) na etapa de limpeza e pré-concentração de amostra para análise de micotoxinas. CIA ideal deve limpar o extrato alimentar, reduzindo-se os interferentes da matriz em nível mínimo, além de proporcionar rapidez, facilidade no manuseio e pouco ou nenhum uso de solvente orgânico (SANCHEZ *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2008; KRSKA *et al.*, 2008).

CIA emprega Ac covalentemente ligado ao suporte (sílica, poli-etilenoimina, hidrazida e CNBr-Sepharose ativada 4B ou agarose), para fornecer extração seletiva de analito presente em mistura complexa de um matriz alimentar (RHEMREV-BOOM *et al.*,

2001; EDINBORO; KARNES, 2005). A afinidade de ligação entre Ag-Ac é determinada pela interação hidrofóbica, ligação eletrostática, força de Van der Waals e ligação de hidrogênio, sendo todos afetados pela característica conformacional e eletrônico, seja de Ag ou Ac (HOLTZAPLLE *et al.*, 1996).

O processo de limpeza ocorre pela retenção seletiva do analito (ex., micotoxina) ao Ac immobilizado na coluna, seguido de eluição com solvente apropriado (Figura 4). Já é de conhecimento que a afinidade de ligação na CIA pode ser afetada por fatores como pH, concentração de sal e ligação competitiva (IP; CHE, 2006).

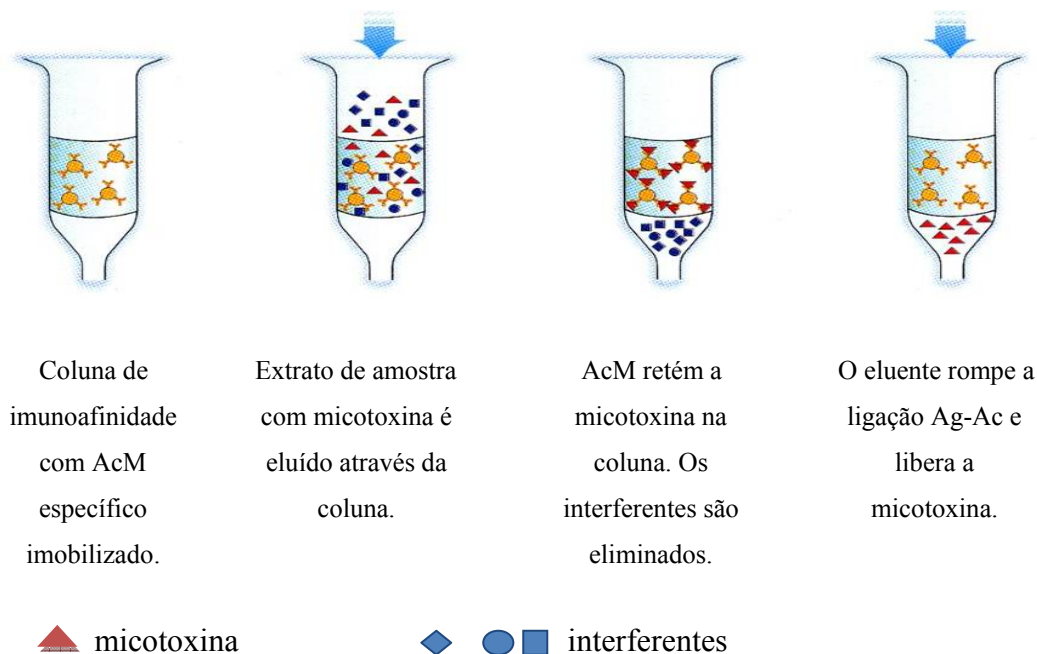


Figura 4 - Princípio da coluna de imunoafinidade

Fonte: R-BIOPHARM RHÔNE Ltd., USA

A limitação da coluna comercial é falha na regeneração e reutilização, sendo que os fabricantes recomendam o uso descartável, com aplicação de apenas uma amostra por coluna. Com o intuito de minimizar o custo de análise, determinados autores sugeriram a regeneração da CIA utilizando tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4, seguida de manutenção da coluna úmida por pelo menos 24 horas a 4 °C antes de reutilização (KONDO *et al.*, 2000; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; CALLERI *et al.*, 2007; FUJII, 2007).

Rhemrev-Boom *et al.* (2001) testaram a estabilidade de CIA perante análise de estradiol (solução padrão e amostras) procedendo determinação semanal por 6 meses; a coluna armazenada a 4-8 °C manteve ativa, com mínima degradação do Ac. Sanchez *et al.* (2007) desenvolveram CIA para detectar herbicida triclopyr capaz de manter a taxa de recuperação na faixa de 80 % após 30 usos.

Nakajima *et al.* (1990) reportou o reuso de CIA antiocratoxina A por mais de 30 vezes sem perder a atividade de ligação do anticorpo acoplado, sendo após o uso a coluna lavada com tampão Tris-HCl 1 M (pH 8,5) com NaCl 0,5 M e tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5) com NaCl 0,5 M e armazenado a 4 °C.

Miyamoto (2007) desenvolveu CIA para analisar AF, em que conseguiu reutilizar 8 vezes a coluna sem alterar a taxa de recuperação (abaixo de 90 % de recuperação da toxina), executando a regeneração da coluna com metanol e PBS.

2.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL

A técnica de hibridoma desenvolvida por Köhler e Milstein (1975) permitiu a produção ilimitada de anticorpo monoclonal (AcM) caracterizada pela alta especificidade, uniformidade e afinidade constante a um único epítipo. O hibridoma é gerado pela fusão de esplênocitos secretores de Ac com célula de mieloma (TIZARD, 1995; ROITT *et al.*, 1997). Kawamura *et al.* (1988) utilizaram camundongo BALB/c imunizadas com conjugado AFB₁-BSA, para obter células esplênicas secretora de IgG. A fusão destes linfócitos sensibilizados com células de mieloma linhagem SP2/0-AG14 permitiu obtenção de hibridomas, que foram selecionados em meio HAT (meio *Dulbecco's modified Eagle's*, contendo 100 µM de hipoxantina, 0,4 µM de aminopterina e 16 µM de timidina) e triados por ELISA não-competitivo indireto perante presença de AcM antiAFB₁.

Anteriormente, a produção em massa de AcMs era obtida inoculando hibridomas selecionados em cavidade ascítica de rato ou camundongo. A prática de tecnologia *in vitro* ocorreu pela preocupação ética, assim como reduz a necessidade de pessoas com experiência em manejar animais (ILAR, 1999; HEILMANN *et al.*, 2005). Métodos *in vivo* para produção de AcMs causam dor e sofrimento aos animais, além de conter proteínas animais e outros contaminantes, requerendo etapas de purificação (ILAR, 1999).

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

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

A técnica de cultivo celular pode ser aperfeiçoada pela remoção completa de soro animal do meio de cultura, a exemplo de *Hybridoma-serum free médium* (H-SFM) (LEGAZPI *et al.*, 2005; EVEN *et al.*, 2006). O meio de cultura livre de soro fornece benefícios técnicos e segurança, já que reduz a probabilidade do perigo de contaminação oriundo de material biológico como príon, vírus e micoplasma. Sendo meio de composição definida, permite controle de multiplicação celular, facilita purificação de AcM por conter menor teor de componentes interferentes, diminuindo o custo de imunorreagente produzido (LEGAZPI *et al.*, 2005; EVEN *et al.*, 2006).

A produção de AcM tem permitido o desenvolvimento de métodos imunquímicos, como ELISA, que é uma alternativa para análise de triagem de micotoxinas em amostras; assim como, de CIA, utilizada na etapa de limpeza e concentração do analito. Ambos visam minimizar o custo e tempo de análise no controle e segurança em alimentos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpo monoclonal antiaflatoxina utilizando hibridoma AF4 e/ou AF2, fornecido pelo intercâmbio com o grupo de *Kagawa University*, Japão. Assim como, usá-lo como bioferramenta para análise de AFB₁ em matriz alimentar, desenvolvendo ic-ELISA e CIA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar e manter hibridoma secretor de AcM IgG específico para aflatoxina;
- Produzir IgG antiAFB₁ procedendo cultivo de hibridoma em meio sintético, seguido de concentração e purificação;
- Padronizar imunoenensaio ic-ELISA para análise de AFB₁ em matriz alimentar;
- Avaliar a eficiência de ic-ELISA em amostras de matriz positivas para AFB₁;
- Confeccionar CIA empregando IgG antiAFB₁ e Affi-Gel 10.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia executada no transcurso da pesquisa foi esquematizada sob forma de fluxogramas, conforme apresentado abaixo. O procedimento técnico, redigido em detalhes, foi inserido em cada capítulo descrito posteriormente.

4.1 MANUTENÇÃO DE HIBRIDOMA LINHAGEM AF2 E AF4 PARA PRODUÇÃO DE IGG ANTI AFB_1

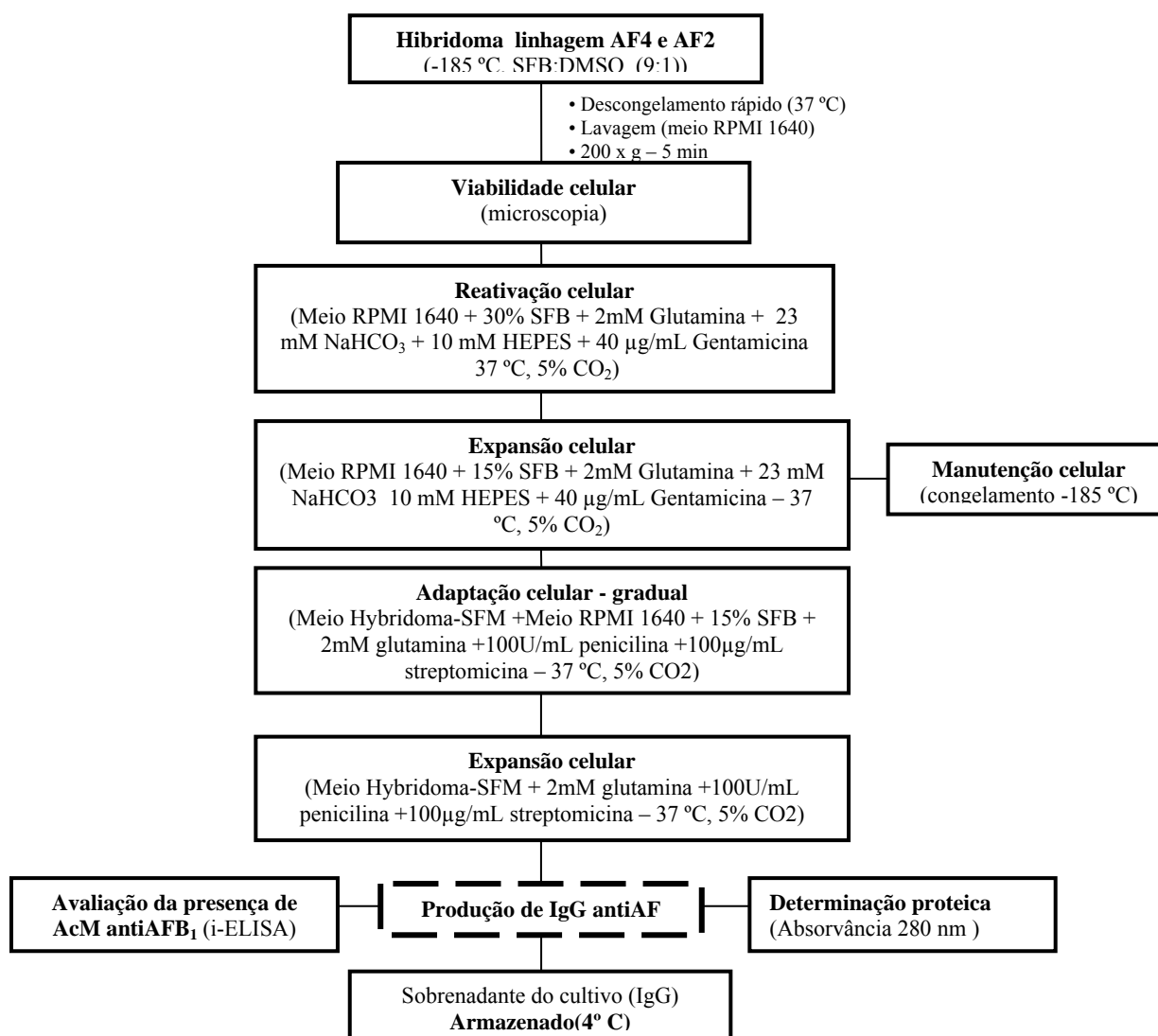


Figura 5 – Reativação, expansão e manutenção dos hibridomas AF2 e AF4 e produção de IgG anti AFB_1 em meio sintético.

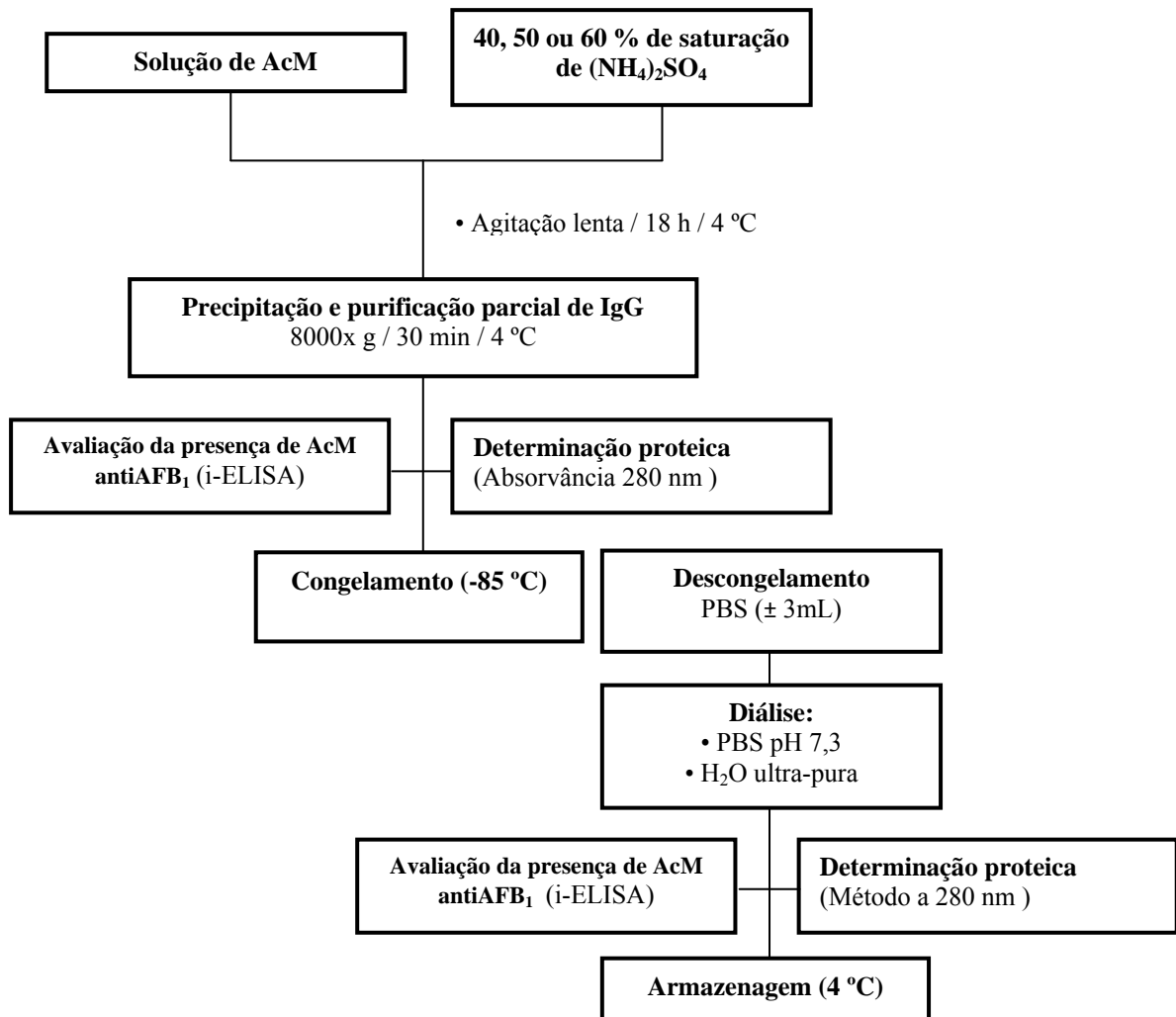
4.2 PURIFICAÇÃO DE IGG ANTI AFB_1 

Figura 6 – Purificação, armazenamento e diálise de IgG anti AFB_1 produzido em meio sintético.

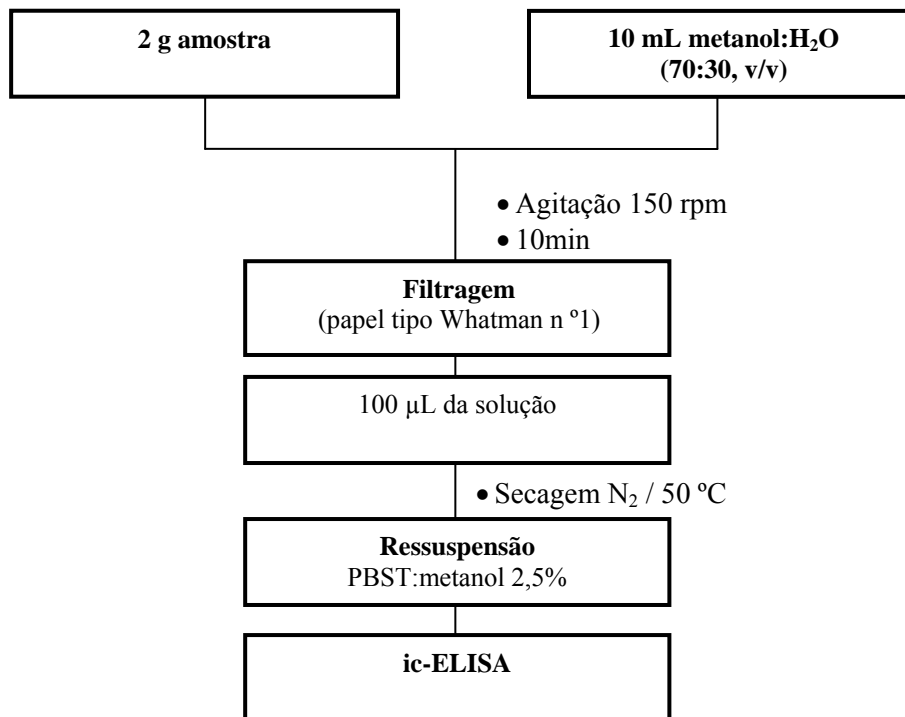
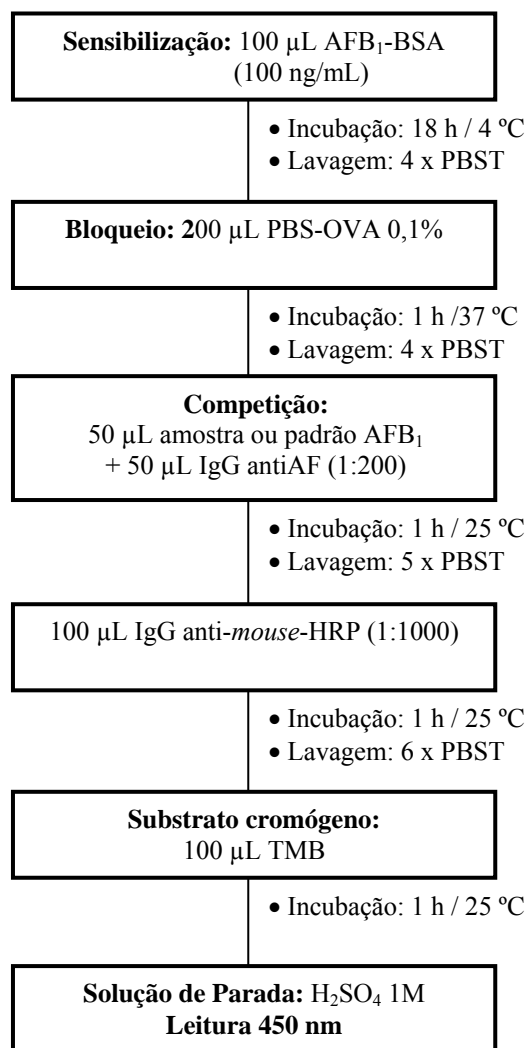
4.3 EXTRAÇÃO DE AFB₁ PARA ANÁLISE POR IC-ELISA

Figura 7 – Extração de AFB₁ em amostra de milho, páprica, paçoca e pé de moleque (RIDASCREEN® Aflatoxin Total)

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE AFB₁ POR IC-ELISA

ELISA COMPETITIVO INDIRETO

(KAWAMURA *et al.*, 1988, adaptado)**Figura 8** – Quantificação de AFB₁ por ic-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1988 adaptado).

4.5 CONFECCÃO DE COLUNA DE IMUNOAFINIDADE

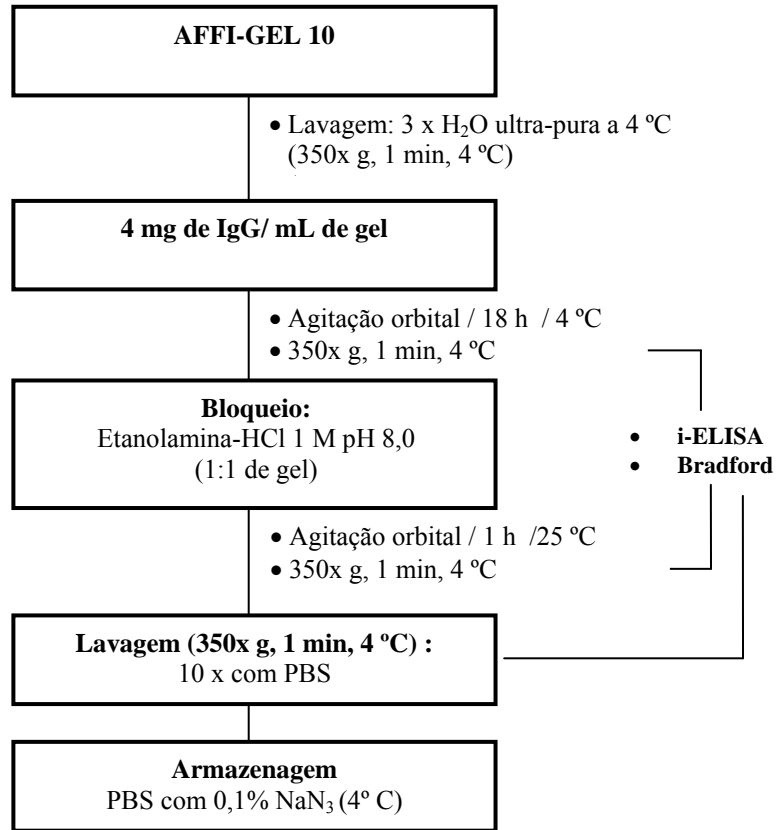


Figura 9 – Preparo da coluna de imunoafinidade utilizando suporte Affi-Gel 10 e IgG antiAFB₁ produzido.

Os material e métodos detalhados, assim como os resultados foram redigidos sob forma de capítulos para publicação, listados abaixo:

CAPÍTULO I

ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFB₁: PRODUÇÃO *IN VITRO* VISANDO DESENVOLVIMENTO DE BIOFERRAMENTAS

CAPÍTULO II

IC-ELISA PARA AFLATOXINA UTILIZANDO ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFB₁ PRODUZIDO POR HIBRIDOMA AF2

CAPÍTULO III

COLUNA DE IMUNOAFINIDADE DESENVOLVIDO COM AFFI-GEL 10 E ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFLATOXINA B₁ COMO BIOFERRAMENTA VISANDO DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE AFLATOXINAS

5 CAPÍTULO I – ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFB₁: PRODUÇÃO *IN VITRO* VISANDO DESENVOLVIMENTO DE BIOFERRAMENTAS

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

AcM antiAFB₁ (linhagem AF2 com 133 % de reatividade cruzada com AFB₂ e linhagem AF4 com 122 % de reatividade cruzada com aflatoxicol) previamente preparado por Kawamura *et al.* (1988); AFB₁ padrão (cat. no. A6636), AFB₁-BSA (cat. no. A6655), anticorpo IgG anti-*mouse*-HPR (cat. no. A4416), etanolamina-HCl (cat. no. 18674-0), glicina-etil-éster (cat. no. G650-3), ovalbumina (cat. no. A5378), TMB líquido (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina) (cat. no. T0440), *coomassie brilliant blue* R (cat. no. B0630), corante vital Azul de Trypan (cat. no. T6146), saco para diálise (membrana de celulose) (cat. no. D9777), reagente de Bradford (cat. no. B6916), DMSO estéril (cat. no. D260) (Sigma Chemical Co., USA); microplaca de 24 orifícios, criotubo (Corning, USA); filtro de microfibra de vidro (GF/C 2,5 cm i.d) (Whatman International Ltd., UK); meio RPMI 1640 (cat. no. 31800-04), meio *Hybridoma*-SFM (*serum free medium*) (cat. no. 12300-067) soro fetal bovino (SFB) (cat. no. 312657-029), penicilina-estreptomicina líquido (5000 U/mL de penicilina G e 5000 µg/mL de estreptomicina) (cat. no. 15070-063), L-glutamina (cat. no. 21051-024) (Gibco Co., USA); sulfato de amônio (Sigma-Aldrich, Inc., USA, cat. no. A5132 e Synth, Brasil, cat. no. S1051.01.AG); frascos para cultivo de células de 25, 75 e 150 cm² (TPP, Suíça); tubo de centrífuga 50 mL (Labcon, Petaluma, USA); membrana GS em éster de celulose (0,22 µm de poro, 2,5 mm i.d.) (Millipore Corp., USA); HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico) (Acros Organics, USA, cat. no. 7365-45-9); sulfato de gentamicina (80 mg/mL) (Schering Corporation, USA); metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA); marcador molecular BenchMarkTM Protein Ladder (Invitrogen, USA, cat. no. 10747-012); ácido acético glacial (Synth, Brasil); água ultrapura (Purelab[®] Classic UF, Elga Labwater Global Operation, UK); recipiente para congelamento de criotubos (*Bio Freezing Vessel*, Bicell, Nihon Freezer Co., Japão) agitador magnético (Fisatom, Brasil); banho a 37 °C; banho ultrassônico (*Ultrasonic cleaner* Unique); câmara de Neubauer (Inlab, Brasil);

centrífuga (EV:250-M, Evlab, Brasil); centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, 3805 03551, Alemanha); cuba para eletroforese (Mighty Small II SE 250/SE260, Hoefer Pharmacia Biotech, Inc., USA); espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20 (GMB, Brasil); freezer (-85 °C) (CFC FREE, Sanyo, USA); fluxo laminar (Clean Plus CL FV-09, Veco, Brasil); homogeneizador (BHS-30, Benfer, Brasil); homogeneizador de tubo (Lab Dancer S25, IKA® Work, Inc., Alemanha); incubadora sob 5 % CO₂ (modelo 3110, Forma Scientific, USA); N₂ gasoso; leitora de ELISA (Bio-Tek Instruments ELX800, USA); microscópio invertido (Lamba LGD2, ATTO Instruments Co., China); peagâmetro (Digimed DM-22, Digicrom Analítica Ltda, Brasil); recipiente de nitrogênio líquido a -185 °C (Cryo Diffusion, França).

LINHAGEM DE HIBRIDOMA

O hibridoma linhagem AF4 e AF2 secretor de AcM específico para AFB₁ (isotipo IgG₁ lambda), derivada de mieloma linhagem SP2/0-AG14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, foram produzidas por Kawamura *et al.* (1988) em *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo* e, mantidas em *Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University*, Japão.

O hibridoma AF4, secretor de AcM IgG₁ antiAFB₁, foi selecionado para uso, baseado no melhor perfil perante especificidade a AFB₁ e menor reatividade cruzada com as demais aflatoxinas. O hibridoma AF2 foi selecionado pela maior viabilidade celular durante o cultivo e manutenção a -85 °C. A tabela 1 apresenta o perfil da reatividade cruzada de AcM produzido pelo hibridoma AF2 e AF4 perante análogos de AFB₁.

Tabela 1 - Reatividade cruzada de anticorpo monoclonal produzido por hibridoma linhagem AF4 e AF2 com análogos de AFB₁, analisadas por ic-ELISA.

Aflatoxina	% reatividade cruzada	
	AF4	AF2
B ₁	100	100
B ₂	2,3	133
G ₁	3,4	13,4
G ₂	2,4	14,7
AFL I ^a	14,1	2
AFL II ^b	122	5,5
M ₁	4,5	0,9
Q ₁	10,8	>0,5
P ₁	>1,3	0,9
B _{2a}	>1,3	>0,5

^a AFL I, isômero natural de [1S]-aflatoxicol

^b AFL II, isômero natural de [1R]-aflatoxicol

ic-ELISA: Ensaio imunoenzimático indireto competitivo

Fonte: KAWAMURA *et al.*, 1988.

CULTIVO DE HIBRIDOMA E PRODUÇÃO DE ACM ESPECÍFICO PARA AFLATOXINA

MANUTENÇÃO E RECUPERAÇÃO DE HIBRIDOMA

Os hibridomas estocados a -185 °C em nitrogênio líquido foram recuperados por descongelamento rápido do criotubo em banho a 37 °C, lavados com 10 mL de meio RPMI a 37 °C e centrifugados (200x g, 5 min). Descartado o sobrenadante, as células foram avaliadas microscopicamente com corante vital Azul de Trypan e a viabilidade celular pós-congelamento foi calculada e expressa em porcentagem:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{células viáveis pós-congelamento}}{\text{células viáveis pré-congelamento}} \times 100$$

Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (RPMI) com 30 % SFB, 2 mM de L-glutamina, 23 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES e 40 µg/mL de gentamicina, para estimular a recuperação do hibridoma congelado. O cultivo

procedeu-se em microplaca de 24 orifícios e frasco de 25 cm² a 37 °C com 5 % CO₂. Posteriormente, procedeu a expansão celular para frascos de cultivo de 25, 75 e 150 cm², assim como diminuição gradativa de SFB até 15 % no meio RPMI.

Uma parte do cultivo reativada e expandida (RPMI com 15 % de SFB) foi preservada em SFB contendo agente crioprotetor dimetil sulfóxido (DMSO) na proporção 9:1 (v/v) em N₂ líquido a -185 °C (HARLOW; LANE, 1988a; KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*). Assim, as células foram centrifugadas (200x g, 5 min) e ressuspensas em solução de SFB:DMSO (9:1) resfriada a 4 °C. Alíquotas de 0,5 mL desta suspensão contendo 2,5 x 10⁶ a 2,5 x 10⁷ células/mL foram introduzidas em criotubos e mantidas a -85 °C por 24 h em recipiente para congelamento lento (Bio Freezing Vessel, Bicell, Nihon Freezer Co., Japão), sendo posteriormente transferidas para um recipiente contendo N₂ líquido (-185 °C).

CONTAGEM E ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi combinada a 100 µL da solução de corante vital Azul de Trypan (0,25 % em meio RPMI, p/v) e as células viáveis (refringentes, com citoplasma homogêneo e membrana íntegra) contadas em câmara de Neubauer (x100).

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

PRODUÇÃO DE ACM IGG EM MEIO SINTÉTICO *Hybridoma*-SFM

Os hibridomas cultivados em meio RPMI com 15 % de SFB (37 °C, 5 % de CO₂) foram adaptados em meio *Hybridoma*-SFM (*serum free médium*, H-SFM, Gibco Co., USA), adicionando gradualmente 25, 50 e 75 % de H-SFM suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (HEUSSNER *et al.*, 2007; KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*).

A produção de AcM foi realizada em cultivo estático por aproximadamente 15 dias sem reposição de meio, até morte celular. O sobrenadante de cultivo contendo os AcM

IgG antiAFB₁ foi centrifugado (2400x g, 10 min, 4 °C) para remover material celular. O volume total do sobrenadante foi avaliado quanto à concentração proteica a 280 nm e atividade antiAFB₁.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (IGG)

A concentração proteica (IgG) foi determinada a 280 nm, adotando coeficiente de absorção (E₂₈₀) de 1,35 para IgG (HARLOW; LANE, 1988b):

$$\text{IgG (mg/mL)} = \frac{\text{absorvância a 280 nm}}{\text{coeficiente de absorção}}$$

DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIAF POR I-ELISA

Presença de IgG antiAF produzido nos sobrenadantes de meio sintético RPMI e *Hybridoma*-SFM foi determinado por i-ELISA (Ensaio imunoenzimático indireto), sendo o protocolo similar ao descrito por Kawamura *et al.* (1988). As microplacas foram sensibilizadas com 100 µL de AFB₁-BSA (2,5µg/mL, tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1M pH 9,6) e incubadas a 4 °C por 18 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 200 µL solução ovalbumina 0,1 % em PBS e incubadas por 1 h a 37 °C. Após 3 lavagens com PBST, adicionou-se 100 µL de sobrenadante do cultivo ou dialisado e incubadas a 25 °C por 1 h. Após 4 lavagens com PBST, adicionou-se 100 µL de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* diluído a 1:10³ em PBST e incubadas a 25 °C por 1 h. Após 5 lavagens com PBST, adicionou-se 100 µL da solução de substrato cromógeno TMB por 30 min a 25 °C e, a reação enzimática interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M e absorvância lida a 450 nm.

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ANTICORPO MONOCLONAL IGG ANTIAFB₁

PRECIPITAÇÃO COM (NH₄)₂SO₄

O sobrenadante de cultivo com Ac antiAF foi adicionado de (NH₄)₂SO₄ sob agitação lenta até concentração final de 40, 50 ou 60 % de saturação para precipitação e purificação parcial de IgG. O precipitado proteico obtido foi mantido a 4 °C por 16 h sob agitação, centrifugado (8000x g, 30 min, 4 °C), transferido para tubo limpo e mantido a -85 °C (KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*).

DIÁLISE DE PROTEÍNA

Para uso, o concentrado proteico precipitado com (NH₄)₂SO₄ foi descongelado e dissolvido em menor quantidade possível de PBS (adicionar 1-2mL de PBS para o precipitado oriundo de 500 mL de sobrenadante, para obter concentração aproximada de 4,0 mg/mL de AcM). A diálise (*cut-off* de 12000-16000 MM, tamanho 25 mm x 16 mm) foi realizada empregando-se PBS (4 x 1 L) a 4 °C por 16 h. A solução de AcM parcialmente purificada foi dialisada em água ultrapura (4 x 1 L) para remoção de (NH₄)₂SO₄. A concentração proteica (IgG) foi determinada no sobrenadante pós-precipitação com (NH₄)₂SO₄ e pós-diálise e atividade do AcM averiguado por i-ELISA.

ELETROFORESE EM SDS-PAGE

Para avaliar a pureza e quantidade de AcM produzido por hibridoma AF4 e AF2 no meio RPMI e H-SFM foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), descrita por Laemmli (1970). O AcM (1 mg/mL) foi diluído em tampão de amostra 3 vezes concentrado e, alíquota de 3,75 µL, correspondente a 2,5 µg de proteína, foi aplicada no gel paralelamente com 5 µL do padrão de marcador molecular (BenchMarkTM Protein Ladder, Invitrogen, USA). O gel de concentração (*stacking*) foi de 5 % de acrilamida, enquanto que de corrida (*running*) foi 10 %. Após corrida por 1h sob 20 mA, o gel foi corado com solução de *Coomassie blue* (Coomassie Brilliant Blue R, Sigma, USA) e descorado com ácido acético:metanol:H₂O (1:4:5), para a visualização e distinção de bandas proteicas.

Ic-ELISA

A capacidade da ligação de AcM antiAFB₁ ao antígeno específico (AFB₁) foi analisada por ELISA competitivo indireto (KAWAMURA *et al.*, 1988). As microplacas foram sensibilizadas, bloqueadas e lavadas conforme descrito para i-ELISA. Após a etapa de bloqueio e lavagem, adicionou-se 50 µL de AFB₁ padrão nas concentrações de 0 a 200 ng/mL seguida 50 µL de AcM antiAFB₁ (1:2000 em PBST), e agitou-se levemente a placa. Após incubação a 25 °C por 1h, as placas foram submetidas a 5 lavagens com PBST. As etapas posteriores foram executadas conforme anteriormente descrito para i-ELISA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade celular pós-descongelamento rápido de hibridoma AF2 (mantida a -185 °C desde 06/04/2004) e AF4 (desde 11/08/2006) foi de 4,27 % e 3,97 %, respectivamente. Os fatores prejudiciais relevantes à viabilidade celular consistem da exaustão de nutrientes, acúmulo de compostos indesejáveis provenientes do metabolismo, restrição de oxigênio e CO₂ devido ao longo período congelado (LEGAZPI *et al.*, 2005). Soma-se ainda, o uso de DMSO como agente crioprotetor, capaz de injuriar células devido à interação com membrana celular. A toxicidade de DMSO aumenta em temperatura alta, portanto recomenda-se adicionar DMSO em soro (1:9) mantido a 4 °C e imediatamente iniciar o processo de congelamento (WEWETZER; DILMAGHANI, 2001). Recomenda-se o congelamento lento mantendo os criotubos em recipiente para congelamento (*freezer* -85 °C por um dia, antes de armazenar a -185 °C), mas o descongelamento em banho a 37 °C e centrifugação devem ser rápidos, devido à toxicidade de DMSO.

No contexto hibridoma AF4 cultivado na Universidade de Kawaga, Japão, apresentou viabilidade de 80 % (KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*). Portanto, a baixa porcentagem de viabilidade celular observada neste estudo provavelmente decorreu de fatores inerentes de condições do nosso Laboratório, ainda em processo de adaptação. Embora os resultados apresentassem baixo valor de viabilidade pós-criopreservação (Figura 10), a contagem de 4,2 x 10⁵ células viáveis/mL para AF2 e 5,45 x 10⁵ células viáveis/mL para AF4, permitiu o prosseguimento para a etapa de expansão celular.

A produção de AcM iniciou-se com o cultivo de hibridoma AF4 (recuperação e expansão), pela capacidade de produzir Ac com maior especificidade para

AFB₁ (KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*). Todavia, o cultivo não pode ser prosseguido à etapa de adaptação no meio H-SFM, devido à dificuldade na multiplicação celular, além de não sobreviver no meio com SFB reduzido para 10 %, embora fosse possível nos estudos anteriores (HAYASHI, 2007; FUJII, 2007).

Assim sendo, optou-se pelo cultivo da linhagem AF2 para prosseguir com os ensaios, pela maior estabilidade e facilidade na multiplicação *in vitro* (meio RPMI ou H-SFM). Não obstante, justifica-se a vantagem de meio H-SFM na produção de AcM, já que permite multiplicação celular mesmo em cultivo sem SFB (LEGAZPI *et al.*, 2005; EVEN *et al.*, 2006), i.e. eliminaria presença de diversos componentes oriundos de próprio soro, facilitando a purificação e garantindo a qualidade do reagente produzido.

Outrossim, o desenvolvimento de meio ideal destinado a finalidades específicas visando obtenção de produto celular tem sido processo empírico em contínuo avanço (CHU; UENO, 1977; GROOPMAN *et al.*, 1984; KAWAMURA *et al.*, 1988.; CANDLISH *et al.*, 1989; HOLTZAPPLE *et al.*, 1996; KONDO *et al.*, 2000; FUJII, 2007; HAYASHI, 2007; HEILMANN *et al.*, 2007; HEUSSNER *et al.*, 2007). A exemplo, o cultivo em RPMI iniciou-se simplesmente tamponando o meio com bicarbonato de sódio; a adição de HEPES auxiliou o tamponamento do meio RPMI, garantindo maior tempo de estabilidade por manter pH fisiológico, mesmo sob mudança na concentração de CO₂ devido a respiração celular (BAICU; TAYLOR, 2002).

No nosso ensaio introduziu-se 40 µg/mL de gentamicina no meio RPMI, para inibir a contaminação bacteriana durante o cultivo. Apresentando vida-média de 15 dias no meio de cultura a 37 °C, o uso recomendando de até 50 µg/mL de gentamicina tem favorecido a expansão celular (HARLOW; LANE, 1988a).

Salienta-se a importância da suplementação de meio RPMI com SFB na recuperação e expansão do hibridoma, por conferir fatores hormonais de estimulação e proteínas para transporte de hormônios, minerais, lipídios e outros fatores naturais essenciais na multiplicação celular (AYBAY; IMIR, 2000; LEGAZPI *et al.*, 2005; EVEN *et al.*, 2006). A L-glutamina destaca-se como substrato fundamental no cultivo de hibridoma, constituindo-se em fonte primária de nitrogênio (LEGAZPI *et al.*, 2005; OKESON; RILEY, 2001). A exaustão de glutamina no meio de cultura pode cessar a multiplicação de hibridoma (OZTURK; PALSSON, 1991).

Paralelamente, o desenvolvimento de meio H-SFM visou eliminar problemas inerentes ao uso de SFB, i.e. diminuir o custo do reagente e perigo de contaminação perante determinados patógenos microbianos como prion, vírus e micoplasma

(LEGAZPI *et al.*, 2005; EVEN *et al.*, 2006). Em adição a benefícios técnicos e de segurança, sua composição de caráter definida permite controle no desenvolvimento de cultivo celular, principalmente perante facilidade na purificação de AcM (LEGAZPI *et al.*, 2005; EVEN *et al.*, 2006).

Assim, o crescimento inicial de hibridoma em 100 % de meio RPMI foi adaptado através de adição gradual de meio H-SFM suplementado com L-glutamina, penicilina e estreptomicina na sequência de 25, 50, 75 e 100 %. Para confirmar a capacidade produtora de IgG antiAFB₁ em hibridoma recuperado, assim como a produtividade de AcM em 100 % de meio RPMI antes de prosseguir adaptação e, melhoramento do cultivo adicionando H-SFM, procedeu-se i-ELISA (Tabela 2).

A produção estimada de proteína (Tabela 2), pureza (Figura 11) e avaliação da atividade antiAFB₁ de AcM produzido (Figura 12) foram analisadas no sobrenadante de cultivo da linhagem AF2 e AF4.

AcM de alta pureza pode ser obtido por cromatografia de troca iônica, ou separação por afinidade empregando proteína A ou G (ZOLA; BROOKS, 1982). Não obstante, Fujii (2007) obteve baixa recuperação de antiOTA produzida pelo hibridoma OTA 1 utilizando coluna de proteína G (27,96 %), em relação a recuperação de 83,78 % obtida por precipitação com (NH₄)₂SO₄. Além disso, ocorreu maior redução na atividade antiOTA pós-purificação através da coluna de proteína G (atividade de 62,42 %), em relação à precipitação com (NH₄)₂SO₄ (80,82 %). Portanto, procedeu-se a concentração e purificação parcial do AcM precipitando somente com (NH₄)₂SO₄ (Figura 13). O (NH₄)₂SO₄ remove a molécula de água de proteína, diminuindo a solubilidade e causando precipitação, aliado ao processo simples de baixo custo (HARLOW; LANE, 1988c).

Conforme Tabela 2, adicionando 40 % de (NH₄)₂SO₄ em sobrenadantes de cultivo do hibridoma AF2 em 100 % de RPMI, assim como adicionado de 25, 50 e 75 % de H-SFM, obteve precipitação satisfatória. Entretanto, a mesma saturação de (NH₄)₂SO₄ não permitiu precipitação adequada de sobrenadante em cultivo com 100 % de H-SFM (precipitado delgado e frágil sem aderência ao tubo). Aumentando a saturação de (NH₄)₂SO₄ para 50 % ocorreu formação de precipitado consistente, onde se concentrou maior atividade antiAFB₁, embora o sobrenadante ainda mantivesse turvo (1^a precipitação, Tabela 2). Assim, neste sobrenadante turvo adicionou-se (NH₄)₂SO₄ até 60 % de saturação, obtendo-se precipitação parcial (2^a precipitação, Tabela 2). Segundo Harlow e Lane (1988c), a maioria de outros componentes séricos não precipitam na faixa de 40 a 50 % de saturação, tornando inexpressiva a distinção destas concentrações. Miyamoto (2007) testando precipitação de

AcM antiAFG produzido no meio H-SFM com 40, 50 e 60 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obteve melhor resultado com 60 % de saturação. Outrossim, os nossos resultados apontaram melhor rendimento empregando 50 % de saturação.

Os precipitados foram estocados a $-85\text{ }^\circ\text{C}$, sendo descongelados a $4\text{ }^\circ\text{C}$ somente no momento de diálise para evitar a desnaturação proteica, devendo-se evitar congelamento pós-diálise, já que ocorre perda drástica de atividade (HAYASHI, 2007).

A Tabela 2 também analisa o teor proteico estimado a 280 nm, obtido no decorrer das etapas de pós-cultivo, pós-precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pós-diálise. O hibridoma AF2 produziu em média, 2,94 mg/mL de proteína e AF4, de 2,7 mg/mL. Maior teor estimado de proteínas (9,88 mg/mL em 100 % RPMI e 10,88 mg/mL em 25 % H-SFM) ocorreu em cultivo contendo maior proporção de RPMI, indicando interferência de SFB na leitura a 280 nm. Em contraste, cultivos em meio contendo maior proporção de H-SFM apresentou menor teor proteico (2,29 e 1,80 mg/mL em 100 % H-SFM 1ª e 2ª precipitação, respectivamente), e pode-se inferir que este corresponda ao valor equivalente mais próximo à concentração real de anticorpo produzido. Em suma, o processo de produção de AcM empregando hibridoma AF2 atingiu valor estimado de 385 mg de proteína total, sendo que maior atividade antiAFB₁ ocorreu no cultivo empregando maior proporção do meio H-SFM.

Eletroforese em SDS-PAGE foi realizada para analisar a pureza de AcM produzido em cada etapa do cultivo utilizando meio RPMI e H-SFM (Figura 11). O uso de mercaptoetanol (agente redutor) no preparo das amostras (IgG) rompe as pontes dissulfeto, separando em cadeias pesadas (50 kDa) e cadeias leves (25 kDa) (BOENISCH, 2001). O resultado confirma presença das bandas de $\pm 55\text{kDa}$ e $\pm 25\text{kDa}$, principalmente em 100 % 1ª precipitação, 75 % e 50 % de H-SFM. Nas outras amostras (RPMI, 25 % e 100 % 2ª precipitação H-SFM) as bandas das cadeias do IgG não são evidentes, uma hipótese dessa ocorrência seria devido o IgG produzidos estar em menor concentração em relação as outras proteínas presentes ou não houve a quebra do anticorpo, já que pode se visualizar bandas em $\pm 150\text{ Da}$.

O perfil eletroforético mostrou várias bandas inespecíficas precipitadas pelo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mas não correspondente ao anticorpo. Segundo Harlow e Lane (1988c), este sal também precipita outras proteínas de alta massa molecular, bem como proteínas podem aderir ao precipitado floculante, aumentando impurezas adicionais. Além disso, essas bandas inespecíficas podem ser originárias de resto celulares, devido o cultivo do hibridoma até morte visando obter maior quantidade de anticorpo.

Após a realização de eletroforese em SDS-PAGE foram escolhidos AcM produzidos em meio 100 % H-SFM (1ª precipitação), 75 % e 50 % H-SFM para proceder ic-ELISA e confirmar capacidade de ligação os AcM antiAFB₁ ao antígeno específico (AFB₁).

Antes de ic-ELISA, procedeu-se i-ELISA com as soluções dialisadas (diluição de 1:20 a 1:10⁶ de Ac) (Figura 12). Assim, pôde estimar 50 % da máxima ligação dos anticorpos produzidos e ser o título empregado no ic-ELISA (em torno de 1:2000). A diluição 1:2000 inferida (corresponde a 1,145 µg/mL da solução 100 % 1ª precipitação H-SFM), foi testada com uma menor diluição (1:200, correspondente a 11,45 µg/mL) a fim de verificar a sua veracidade e proceder a realização de ic-ELISA (Figura 14), tendo resultado positivo desse título (1:2000) para reação do imunoensaio. As soluções 50 e 75 % também foram diluídas 1:2000 e no i-ELISA os perfis das curvas foram semelhantes.

O ic-ELISA mostrou que 100 % 1ª precipitação, 50 e 75 % H-SFM apresentam um adequado perfil de atividade antiAFB₁ (Figura 15), sendo apropriados para aplicá-los como bioferramentas para desenvolvimento de métodos para detecção de AF empregando anticorpo.

CONCLUSÃO

O domínio de princípios biológicos básicos é fundamental para a inovação tecnológica envolvendo bioferramentas. O sucesso depende de cuidados e detalhes críticos, que viabilizam o cultivo de hibridoma produtor de AcM tendo como meta a produção ilimitada de Ac destinado à primeira etapa do desenvolvimento de técnicas imunoquímicas. A introdução de meio sintético como H-SFM isento de SFB permite obtenção de reagente com maior pureza, baixo custo e menor perigo; a produção em condição nacional possibilitaria autossuficiência perante reagentes essenciais no diagnóstico rápido dependente de *kits* importados, contribuindo na qualidade e segurança de alimentos.

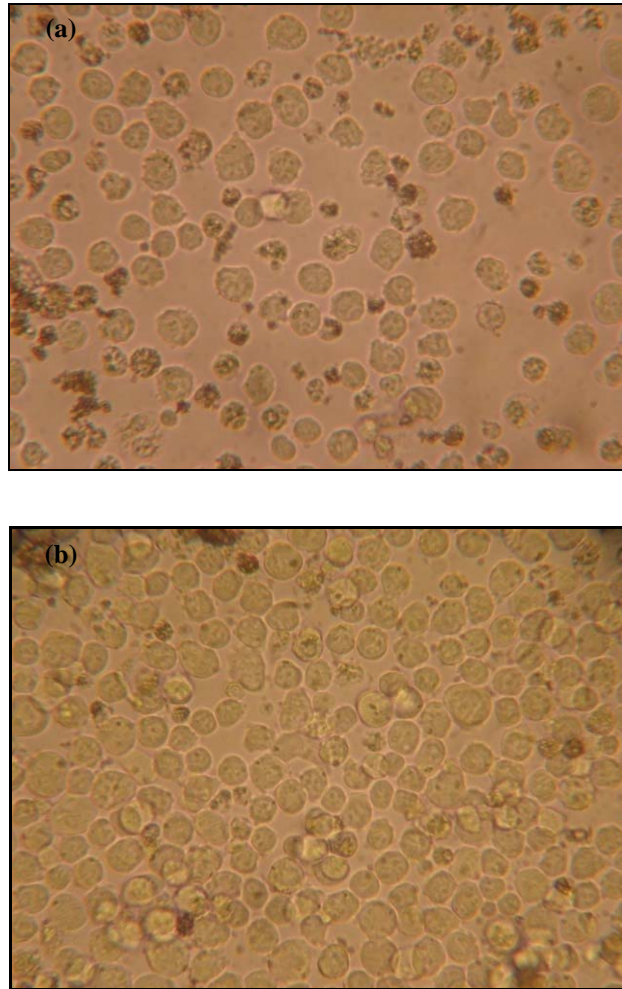


Figura 10 - Vista microscópica (microscópio de fase invertida, aumento de 400x) de células de hibridoma em meio RPMI, (a) após descongelamento rápido em banho a 37 °C, com contagem inicial (em torno de $4,2 \times 10^5$) (b) Saturação celular, após 3-4 dias de cultivo (5×10^5 a 1×10^6 células/mL).

Tabela 2 - Produção estimada de proteína - IgG produzido e atividade antiAFB₁ por hibridoma AF2 e AF4 em diferentes fases de cultivo.

Linhagem	Hibridoma Meio de cultura (%)	Absorção a 280 nm (mg/mL)			i-ELISA (Pós- diálise)	Volume total coletado ou ressuspendido (mL)			Estimação de Quantidade de Proteína (mg) *			Quantidade de tubo (pós- (NH ₄) ₂ SO ₄) - 85°C
		Pós- cultivo	Pós- (NH ₄) ₂ SO ₄	Pós- diálise		Pós- cultivo	Pós- (NH ₄) ₂ SO ₄	Pós- diálise	Pós- cultivo	Pós- (NH ₄) ₂ SO ₄	Pós- diálise	
AF2	RPMI (100) ^a	3,68	22,38	9,88	+	750	5	11	682,50	111,90	108,68	4
	H-SFM (25) ^a	3,67	21,60	10,88	+	600	5	9	734,00	108,00	97,92	3
	H-SFM (50) ^a	2,92	12,65	5,70	+	580	3	6	426,67	37,95	34,20	3
	H-SFM (75) ^a	2,56	7,73	3,32	+	500	3	6	320,00	23,19	19,92	6
	H-SFM (100) ^b	1,86	5,70	2,29	+	860	3	6	266,60	17,10	13,74	6
	H-SFM (100) ^c		5,34	1,80	+		3	7		16,02	12,60	6
AF4	RPMI (100) ^b	2,70	21,21	8,95	+	1120	5	11	504,00	106,05	98,45	6

^a precipitação - 40 % de (NH₄)₂SO₄^b precipitação - 50 % de (NH₄)₂SO₄^c 2ª precipitação – 60 % de (NH₄)₂SO₄ adicionado ao sobrenadante da 1ª precipitação

* estimacão de 1 tubo - restante está congelado; precipitado em sulfato

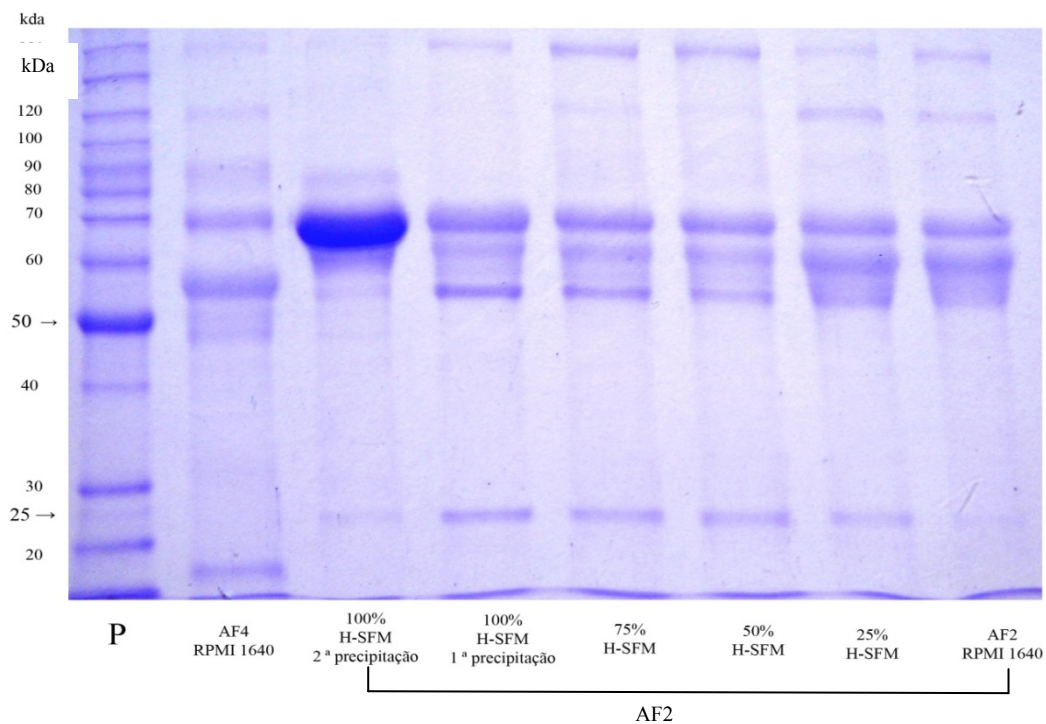


Figura 11 – SDS-PAGE de AcM antiAFB₁ produzido por hibridoma AF2 e AF4 em diferentes etapas de cultivo empregando meio H-SFM e RPMI (100 % RPMI, 25, 50, 75 e 100 % H-SFM). P: marcador de proteína (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen, USA).

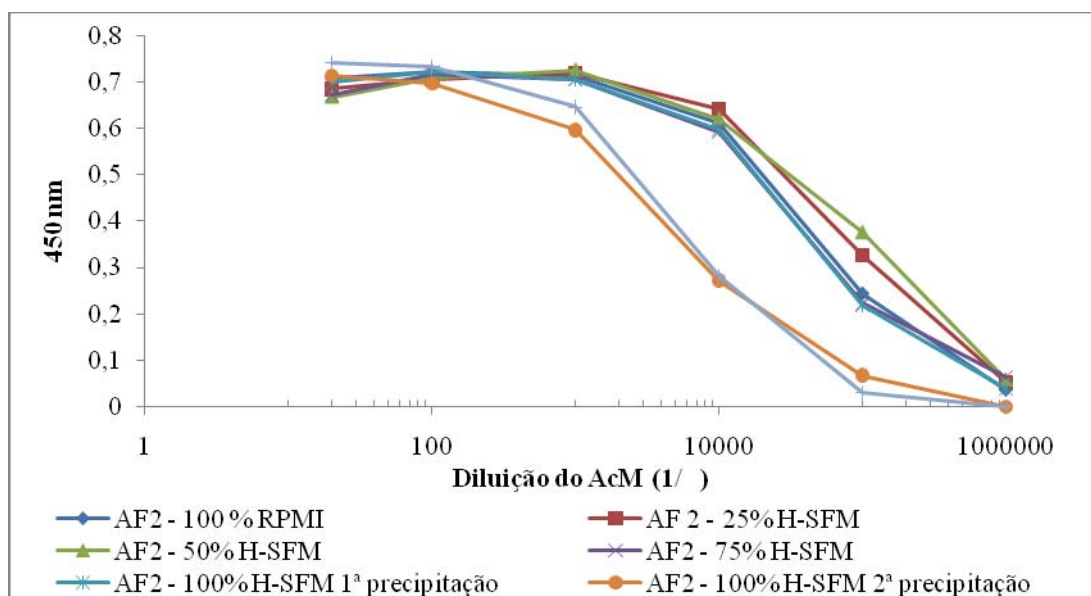


Figura 12- Determinação de atividade antiAFB₁ por i-ELISA dos AcM produzidos por hibridoma AF2 e AF4 em meio 100 % RPMI, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % H-SFM.

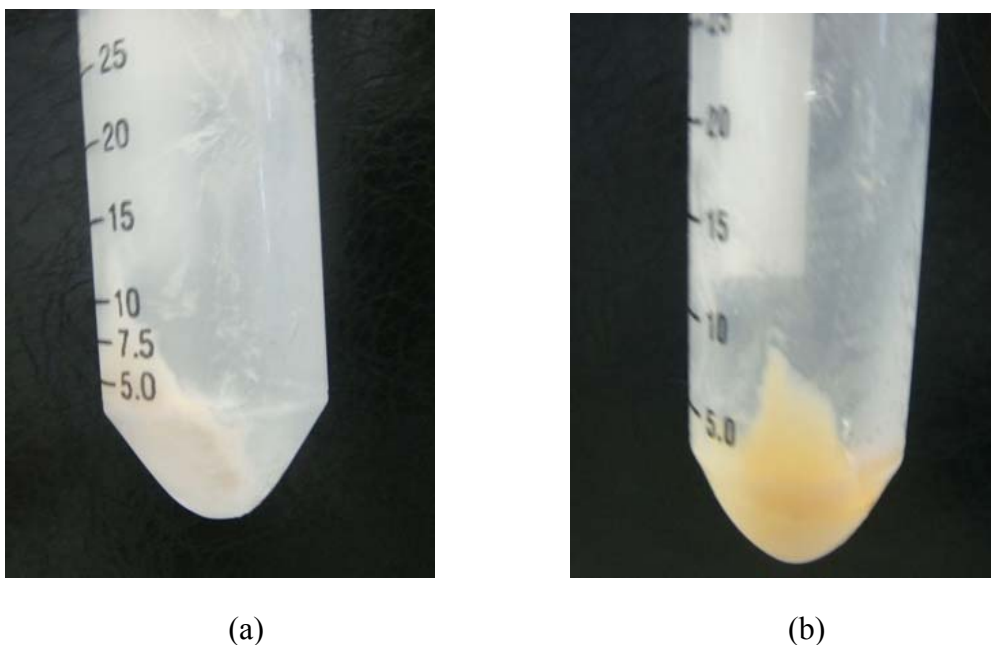


Figura 13 – AcM precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para concentração e purificação parcial do AcM em meio RPMI e H-SFM, sendo que (a) o precipitado com maior teor de RPMI apresenta-se esbranquiçado e (b) onde predomina H-SFM o precipitado tem coloração alaranjada.

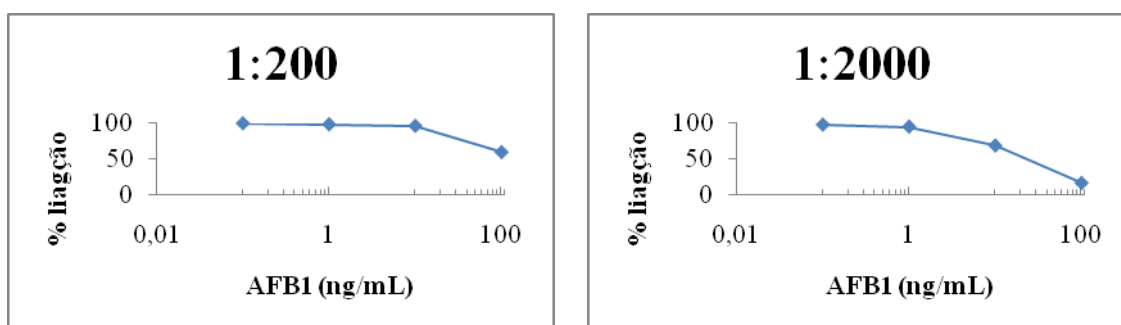


Figura 14 – Curva de ic-ELISA para confirmar o título de AcM (1:2000) que foi estimado através de 50 % da máxima ligação dos anticorpos produzidos pelo hibridoma AF2 em meio 100 % H-SFM, sendo testado título de 1:2000 (50 % da máxima ligação) e diluição menor (1:200).

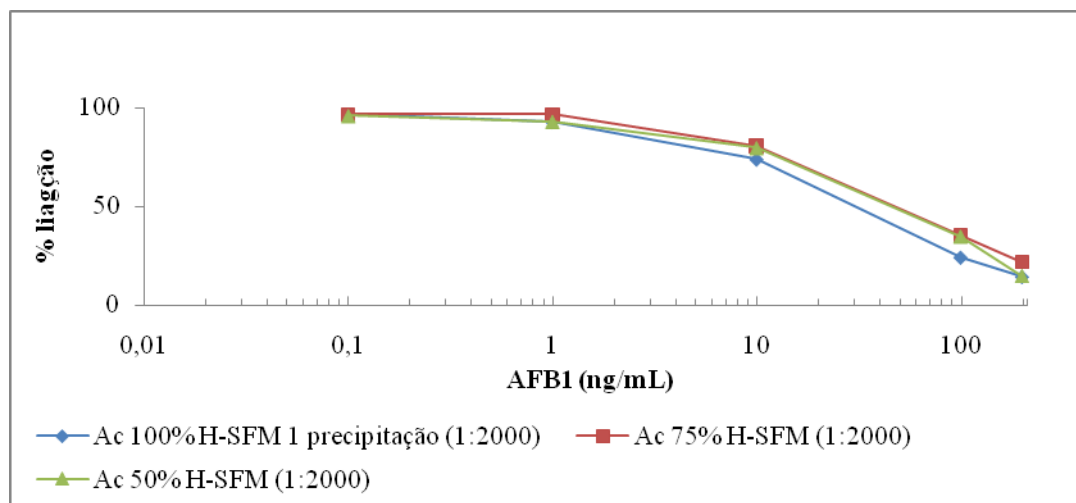


Figura 15 – Avaliação da atividade de AcM antiAFB₁ produzidos em meio de 50, 75 e 100 % H-SFM por ic-ELISA.

6 CAPÍTULO II – IC-ELISA PARA AFLATOXINA UTILIZANDO ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFB₁ PRODUZIDO POR HIBRIDOMA AF2

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

As amostras consistiram de páprica (3 amostras), paçoca (2), pé-de-moleque (1) e milho (1) cedidos gentilmente pelo Instituto Adolf Lutz, São Paulo-SP e milho (2) de Empresas da região do Norte do Paraná, estando as amostras mantidas a -20 °C.

MATERIAL

AcM antiAFB₁ produzido por hibridoma linhagem AF2 (133 % de reatividade cruzada com AFB₂), gentilmente fornecido por Dr. Osamu Kawamura (*Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão*), em 50 % de meio H-SFM; AFB₁ padrão (cat. no. A6636), AFB₁-BSA (5 mg liofilizado, cat no. A6655), anticorpo IgG anti-*mouse*-HPR (cat. no. A4416), ovalbumina (cat. no. A538), reagente de Bradford (cat. no. B6916), 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina (TMB) (cat. no. T2885), peróxido de hidrogênio 30 % (cat. no. H1009), dimetilsulfóxido (DMSO) (cat. no. D260) (Sigma Chemical Co., USA); microplaca de 96 orifícios (Corning, USA); placa de sílica para CCD – sílica gel 60 (Alugram® SilG, Macherey-Nagel, Alemanha); metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA); gua ultrapura (Purelab® Classic UF, Elga Labwater Global Operation, UK); Papel de filtro (Whatman no1, Whatman International Ltd., England); tolueno, acetato de etila, ácido fórmico, clorofórmio grau P.A. (Synth, Brasil); acetato de sódio (NaC₂H₃O₂.H₂O) (Mallinckrodt Inc., USA); agitador magnético (Fisatom, Brasil); banho a 50 °C; banho ultrassônico (Ultrasonic cleaner Unique, Brasil); centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, 3805 03551, Alemanha); espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20 (GMB, Brasil); freezer (-85 °C) (CFC FREE,

Sanyo, USA); homogeneizador de tubo (Lab Dancer S25, IKA® Work, Inc., Alemanha); peagâmetro (Digimed DM-22, Digicrom Analítica Ltda, Brasil); espectrofluorímetro (Varian, Cary-Eclipse, Australia); leitora de ELISA (Bio-Tek Instruments ELX800, USA); lâmpada de UV (modelo UVGL-15, Miralight Lamp, USA); Incubadora refrigerada com agitação (MA830/A, Marconi Equipamentos para Laboratório, Brasil).

EXTRAÇÃO DE AF NAS MATRIZES ALIMENTARES

A extração foi realizada conforme procedimento descrito no *kit* comercial RIDASCREEN® Aflatoxin Total para análise de aflatoxinas por ELISA (R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Alemanha). Alíquota de 2 g de amostra, adicionada com 10 mL de solução metanol grau HPLC:H₂O (70:30, v/v), foi agitada a 150 rpm por 10 min, filtrada (Whatman nº1) e 100 µL do filtrado seco sob fluxo de N₂ a 50 °C. O resíduo foi dissolvido em PBST:metanol 2,5 %.

ELISA COMPETITIVO INDIRETO

PADRONIZAÇÃO DE CONJUGADO AFB₁-BSA

A diluição de conjugado AFB₁-BSA a ser utilizado na sensibilização do imunoensaio foi avaliada por i-ELISA (Ac diluído, 1:20 a 1:10⁶), testando as concentrações de 100, 250, 500, 1000 e 2500 ng/mL em tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1 M pH 9,6, sendo o ensaio realizado em duplicata.

PADRONIZAÇÃO DE ANTICORPO

A diluição ótima de AcM para imunoensaio foi determinada, empregando antiAFB₁ diluído a 1:1000, 1:2000, 1:5000 em PBST e, procedendo ic-

ELISA com o conjugado AFB₁-BSA (100 e 250 ng/mL), fixando-se as demais condições de ensaio.

PREPARO DE SUBSTRATO TMB

Uma alíquota de 100 µL da solução de 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina - TMB (10 mg de TMB em 1 mL de dimetilsulfóxido - DMSO) foi adicionada em 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5,0 e, no momento de uso, acrescentada com 100 µL de H₂O₂ 0,5 %, procedendo homogeneização manual lenta. Foi realizada a análise de tempo de reação do TMB (10, 20 e 30 min) no ic-ELISA, visando obter leitura ótima.

PROCEDIMENTO

ELISA competitivo indireto foi realizado seguindo o protocolo descrito por Kawamura *et al.* (1988) adaptado conforme nossa condição laboratorial. As microplacas foram sensibilizadas com 100 µL de AFB₁-BSA (100 ng/mL, Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1M pH 9,6) e incubadas a 4 °C por 18 h. Após 4 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 200 µL solução ovalbumina 0,1 % em PBS e incubadas por 1 h a 37 °C. Após 4 lavagens com PBST, adicionou-se 50 µL de padrões AFB₁ ou amostra diluída, seguida de 50 µL AcM antiAFB₁ produzido em cultivo com 50 % H-SFM (1:2000 em PBST), procedendo reação em duplicata para curva padrão e triplicata para amostras, agitou-se levemente a placa, foi incubado a 25 °C por 1 h. A placa foi lavada 5 vezes com PBST, adicionada de 100 µL de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* (1:10³ em PBST) e incubada a 25 °C por 1 h. Após 6 lavagens com PBST, 100 µL da solução de substrato cromógeno TMB foi adicionado. Após 30 min a 25 °C, a reação enzimática foi paralisada com 50 µL de H₂SO₄ 1M e a absorbância lida a 450nm.

A média de absorvâncias foi calculada a partir de valores individuais obtidos e os resultados expressos em porcentagem de ligação:

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

Onde A^+ corresponde à média de absorvância na presença de amostra ou padrão, enquanto que A^- , a média da absorvância na ausência de toxina (controle negativo). A concentração de AFB₁ foi determinada pela curva padrão (1 a 100 ng/mL de AFB₁), plotando a porcentagem de ligação contra log da concentração de AFB₁.

LIMITE DE DETECÇÃO DO IC-ELISA

O limite de quantificação foi determinado, calculando a média e 3 x desvio padrão dos valores de absorvância do controle negativo (0 ng/mL de AFB₁, 100 % ligação), obtidos em duplicata, sendo o cálculo realizado em diferentes dias.

ANÁLISE DE INTERFERENTES NO IC-ELISA

Dois gramas de amostra (páprica, paçoca e pé-de-moleque adquiridos no mercado local; milho negativo para AFB₁ total analisado por dc-ELISA (Veratox Aflatoxin Neogen Corporation, USA)) foi adicionado de 10 mL de metanol:H₂O (70:30, v/v) e agitado a 150 rpm por 10 min. Após filtração (Whatman n°1), 100 µL foi seco sob fluxo de N₂ a 50 °C e o resíduo suspenso em PBST:metanol 2,5 %, para obter diluição no fator de 1:2 a 1:10.

RECUPERAÇÃO DE AFB₁ EM MATRIZES ALIMENTARES

As amostras de páprica, paçoca, pé-de-moleque e milho foram contaminadas artificialmente com solução padrão de AFB₁ (100 ng/mL) na concentração final de 20 ng AFB₁/g alimento e mantido a temperatura ambiente por 18 h. A seguir, a AFB₁ foi extraída e quantificada por ic-ELISA conforme descrito acima, sendo o teste de recuperação realizado em duas repetições em triplicata .

CCD PARA ANÁLISE DE MATRIZES ALIMENTARES PARA SELEÇÃO DE CONTROLE NEGATIVO

As amostras de páprica, paococa, pé-de-moleque e milho a serem destinadas ao controle negativo do ensaio foram selecionadas, analisando amostras procedentes de mercados locais por cromatografia de camada delgada - CCD (SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1996). Cinquenta gramas da amostra foi adicionada de 270 mL de metanol e 30 mL de KCl 4 % e agitada a 150 rpm por 5 min. Um volume de 150 mL do filtrado (Whatman no1) foi acrescido de 150 mL da solução de sulfato cúprico a 10 % e 50 g de celite. Após agitação, 150 mL do filtrado foi recolhido e transferido para um funil de separação contendo 150 mL de H₂O destilada. O extrato clorofórmico foi obtido adicionando 10 mL de clorofórmio ao funil de separação e agitado suavemente por 3 min (duas repetioes). A fase clorofórmica recolhida foi juntada e 10 mL seca em banho a 50 C sob fluxo de N₂.

Para análise, o resíduo foi dissolvido com 500 L de clorofórmio sob sonicação por 30 s. Uma alíquota de 20 L de cada amostra foi aplicada em placa cromatográfica de sílica gel (sílica gel 60, 2 mm de espessura) juntamente com 10 L solução padrão de AFB₁ a 1 g/mL, a 2 cm da base. O cromatograma foi desenvolvido em cuba saturada com fase móvel contendo tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (60:40:0,1, v/v/v) para corrida de 10 cm e, observado sob UV longa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de ic-ELISA iniciou-se com a determinação das concentraoes de reagentes a serem utilizados, i.e., conjugado AFB₁-BSA cedido pela *Kagawa University*-Japão e AcM antiAFB₁ produzido por hibridoma AF2 *in vitro*, no meio de cultura com 50 % de meio H-SFM e 50 % de meio RPMI.

Imunoensaio i-ELISA foi realizado para avaliar a influência da concentração de AFB₁-BSA na leitura de absorção a 450 nm ao diluir a concentração de anticorpo (Figura 16). Assim como, a curva foi plotada para obter 50 % da ligação máxima, sendo o título de anticorpo correspondente a esta porcentagem de ligação utilizada para proceder ic-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1988).

A Figura 16 mostra a similaridade na inclinação de curvas obtidas com conjugado AFB₁-BSA na faixa de 100 a 2500 ng/mL, sendo que em 100 ng/mL pôde-se distinguir a absorção entre as diluições de AcM primeiramente, indicando que sensibilização da placa pode aplicar essa concentração e assim também, economizar o reagente. Baseado neste resultado, escolheu-se AFB₁-BSA na concentração de 100 ng/mL para proceder ic-ELISA; além deste valor, também incluiu-se no teste 250 ng/mL de AFB₁-BSA, já que Kawamura *et al.* (1988) realizou com essa concentração a sensibilização do ensaio ic-ELISA para análise de AFB₁ em derivados de amendoim, assim como Devi *et al.* (1999) sensibilizou poços com 225 ng/mL de AFB₁-BSA.

Teoricamente, o título de Ac correspondente a 50 % de ligação seria a diluição ideal para desenvolver ic-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1988). Todavia, a Figura 16 mostra 100 % de ligação equivalente a absorvância de aproximadamente 0,5, portanto infere-se absorvância de 0,25 para 50 % de ligação; este corresponde ao título de AcM $>1:10^5$ (0,018 µg/mL de proteína), sendo isto improvável na condição de ensaio (obteve-se reação negativa procedendo ic-ELISA empregando AcM diluído a 10^{-5}). O fato pode indicar deterioração de substrato utilizado (TMB em pó ou H₂O₂), obtendo-se absorvância máxima em torno de apenas 0,5. *Kits* comerciais informam que leitura $< 0,6$ indica degradação do reagente (RIDASCREEN, R-Biopharm GmbH, Alemanha).

Considerando o insucesso na determinação de título de AcM através da inferência de 50 % da ligação máxima, utilizou dados anteriores (Capítulo 1) em que foi correlacionado título de Ac a 50 % ligação da máxima ligação, sendo de 1:2000. Em vista disso, títulos próximos a esse valor foram avaliados no ic-ELISA.

Visando melhorar a leitura, testou-se tempo de reação do substrato cromógeno entre 10 a 30 min. A reação em 30 min apresentou melhor coeficiente de determinação com $R^2 = 0,84$, seguida de 20 min com $R^2 = 0,58$ e 10 min com $R^2 = 0,65$ ($p < 0,05$). Portanto, os ensaios posteriores foram executados fixando o tempo de reação com substrato em 30 min. Miyamoto (2007) realizou ic-ELISA para análise de AFB₁ reagindo com substrato TMB com tempo de duração de 10 min.

Após reduzir as possíveis concentrações de trabalho dos reagentes, foi realizado ic-ELISA avaliando na sensibilização dos poços 100 e 250 ng/mL AFB₁-BSA e diluição do AcM em 1:1000, 1:2000 e 1:5000 (Figura 17). Os resultados indicaram que experimento empregando 100 ng/mL AFB₁-BSA e 1:2000 (0,92 µg/mL) para Ac

antiAFB₁ como sendo adequado para prosseguir com a padronização, já que as diluições maiores resultaram em valores próximos, podendo economizar reagentes.

Determinadas as condições para ic-ELISA, a curva padrão foi confeccionada, utilizando concentração de AFB₁ a 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 ng/mL em PBST:metanol 2,5 %. A curva apresentou coeficiente de determinação de 0,97 e limite de detecção de 0,99 ng AFB₁/mL (4,95 ng/g) (Figura 18), constituindo uma técnica que atende a legislação brasileira (20 ng/g de AF total para milho, amendoim e derivados). Entretanto, ainda não apresenta sensibilidade desejável para detecção de AFB₁ em algumas matrizes alimentares regulamentados quanto à presença de AFB₁ pela Comunidade Europeia (máximo de AFB₁ permitido é de 2ng/g para amendoim, nozes em geral, frutas secas e cereais).

As amostras aplicadas no estudo da interferência de matriz foram demonstradas negativas perante a análise de CCD (Figura 19). Os extratos de amostras controle negativas para AFB₁ foram submetidos a 4 diluições (1:2, 1:5, 1:7 e 1:10) para estudar o efeito da matriz na análise por ic-ELISA (Figura 20). A Figura evidenciou o efeito das diferentes diluições de extrato no imunoensaio, com interferência significativa em baixas diluições (1:2 e 1:5) ($p < 0,05$ no teste de Tukey) na amostra de páprica. Nessas diluições, possivelmente a alta concentração de componentes alimentares constituídos de proteínas, lipídios e pigmentos causaram interações inespecíficas e bloqueio estérico na reação imunológica, resultando em falso-positivo (HEFLE, 1995; FUJII, 2002). Entretanto para amostra de paçoca o teste de Tukey não demonstrou diferença significativa entre as diluições, e para amostra de pé-de-moleque na diluição entre 1:5 a 1:10 evidenciou similaridade, porém houve diferença significativa para diluição 1:2, indicando que esta seja inadequada para imunoensaio dessa amostra ($p < 0,05$). A diluição 1:5 a 1:10 nas amostras de milho são estatisticamente iguais ($p > 0,05$) e diluições 1:2 e 1:5 idem.

Diluição superior a 1:10 não foi avaliado, já que ic-ELISA desenvolvido apresentou limite de detecção de 4,95 ng/g, portanto a diluição do extrato acarretaria em resultado falso-negativo (ANKLAM *et al.*, 2002; CALLERI *et al.*, 2007; PRIETO-SIMÓN *et al.*, 2007). Sendo assim, a diluição de 1:7 a 1:10, exceto para amostras de páprica que definiu diluição de 1:10, proporcionaria menos interferência das matrizes alimentares, permitindo detecção do analito.

A aplicabilidade de ic-ELISA para análise de AFB₁ foi avaliada perante a taxa de recuperação de amostras de páprica, paçoca, pé-de-moleque e milho contaminados artificialmente (20 ng/g). Assim como, foi realizada comparação dos resultados obtidos por ic-ELISA desenvolvido com resultados positivos obtidos por outros autores e metodologias.

A recuperação das amostras contaminadas, considerando o efeito de interferência da matriz, variou de 186; 90,55; 82,25 e 81,15 % para páprica, paçoca, pé-de-moleque e milho, respectivamente (Tabela 3), sendo o valor recomendado de recuperação para AF de 80 a 110 % para amostras com contaminação > 10 µg/kg de AF (Regulamento (CE) 401/2006, 2006). As amostras de páprica apresentaram alta recuperação (186,69 %) e isso se deve à composição da matriz colorida, sendo que a diluição usada não foi suficiente para diminuir a interferência, devendo aumentar a diluição e/ou adicionar etapa de limpeza do extrato antes do ensaio.

A análise de AFB₁ por ic-ELISA desenvolvida em amostras de páprica, paçoca, pé-de-moleque e milho indica contaminação acima do permitido pela legislação brasileira (20 ng/g de aflatoxinas total) (Tabela 4), devendo confirmar por outra metodologia. Devido o conhecimento da análise de recuperação em amostra de páprica contaminada artificialmente, o resultado provavelmente foi superestimado.

Comparada à literatura (MIYAMOTO, 2007; IAL, 2007 e SILVA, 2007), o resultado do ic-ELISA para as amostras de páprica A6, A7 e A8, paçoca A3, pé-de-moleque A1 e milho A5 e K 1373 confirmou a superestimação de valores (Tabela 5a), demonstrando que esse imunoensaio ainda não é adequado para detectar baixa concentração de AFB₁ e também ser aplicado a matrizes alimentares, como páprica e derivados de amendoim.

Ic-ELISA apresentou resultados próximos obtidos esses autores quando nas amostras foram quantificadas elevada concentração de AFB₁, como nas amostras de milho B e paçoca A2. Todavia, essas amostras exibiram concentração bem superiores tolerados pela legislação brasileira, sendo facilmente detectados em outros métodos.

Kawamura *et al.* (1988) reportaram que o hibridoma da linhagem AF2 produtor de AcM antiAFB₁ possui reatividade cruzada com AFB₂ (133 %). Devido a esse fato, as amostras analisadas por Miyamoto (2007) e IAL (2007) que foram positivas para AFB₂ (paçoca A3 e A2, pé-de-moleque A1, milho A5 e K 1373) foram

acrescentados os valores dessa micotoxina e comparados novamente com ic-ELISA (Tabela 5b).

A adição de AFB₂ nas amostras não aproximou os resultados de ic-ELISA para contaminação abaixo de 20 ng/g, evidenciando que o ic-ELISA desenvolvido é ainda inadequado para determinação de AFB₁ em amostras que podem estar no limiar do aceitável ou não ao consumo, devendo-se estudar melhor o efeito da matriz e estabelecer etapa de limpeza principalmente para amostras de pápricas.

CONCLUSÃO

O ic-ELISA desenvolvido para determinação de AFB₁ apresentou limite de detecção de 4,95 ng/g, não sendo ainda um método adequado de análise em amostras de páprica e derivados de amendoim. Contudo, devido possibilidade de produção de AcM antiAFB₁ e sendo ic-ELISA, um método rápido, exato e simples ao comparar com métodos analíticos, intenciona-se aperfeiçoar o desenvolvimento desse imunoenensaio visando introdução de técnica alternativa para detecção de AFB₁ em matrizes alimentares.

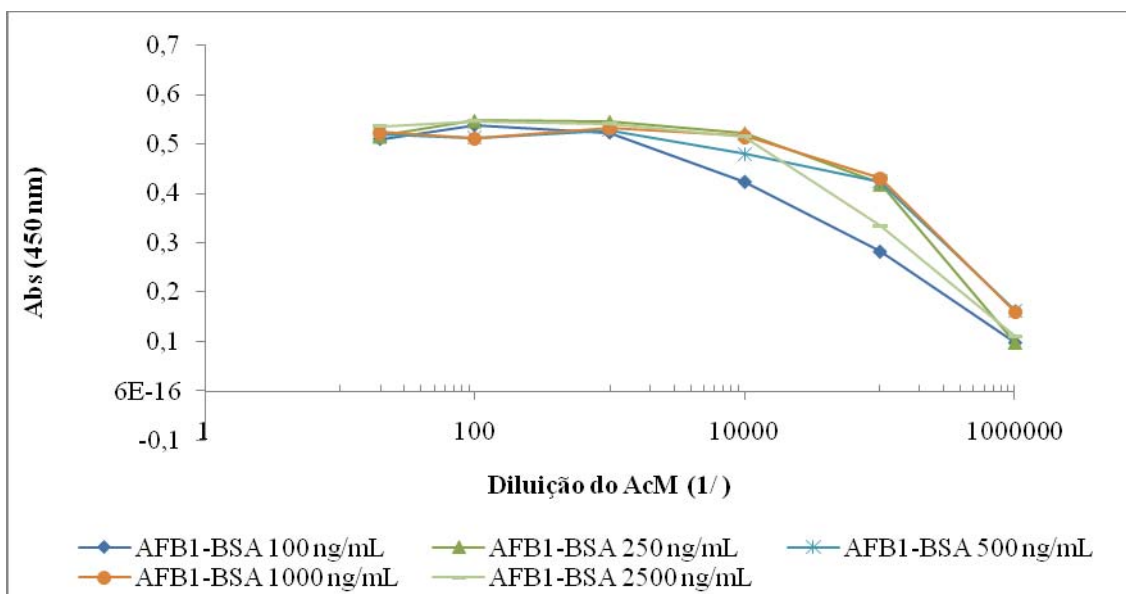


Figura 16 – Determinação da concentração ótima de AFB₁-BSA empregando i-ELISA. Análise de conjugado AFB₁-BSA (100 a 2500 ng/mL) em tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1 M pH 9,6 empregando AcM antiAFB₁.

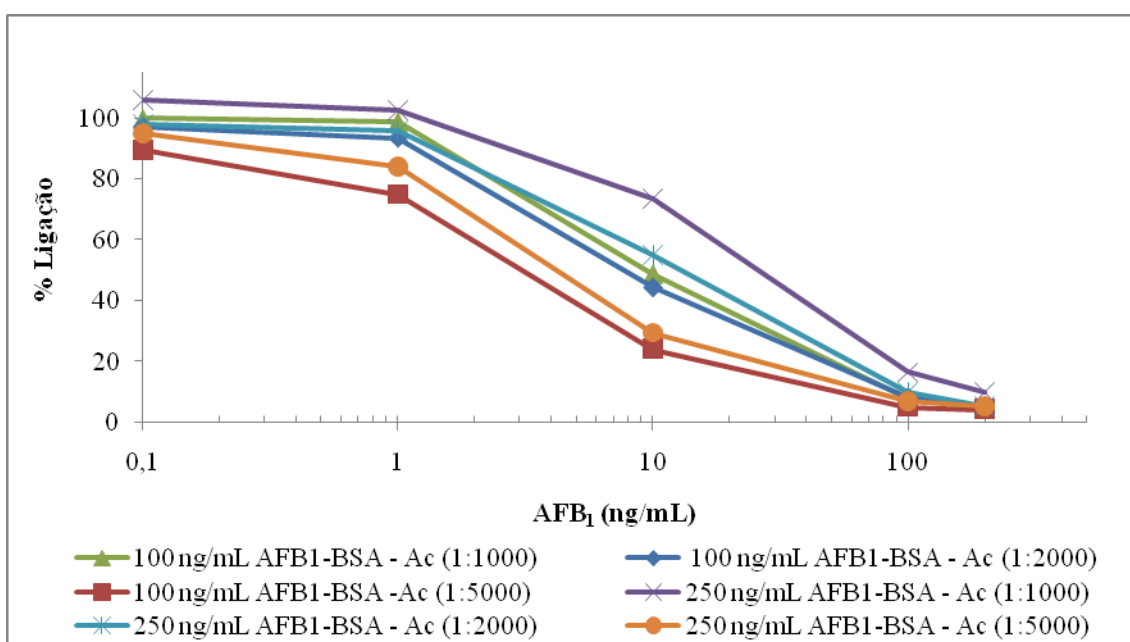


Figura 17 – Determinação do título de AcM antiAFB₁ e concentração de AFB₁-BSA para sensibilização de microplaca empregando ic-ELISA.

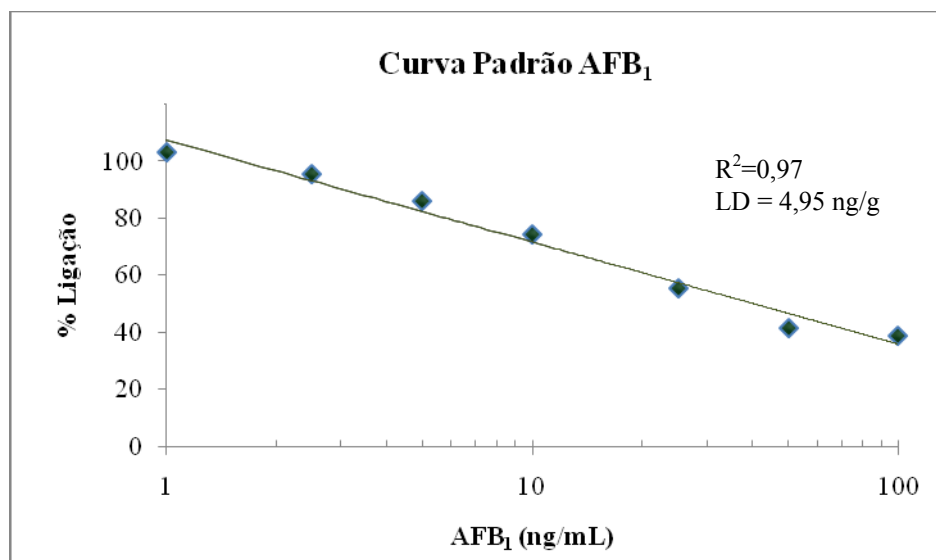


Figura 18 – Curva padrão de ic-ELISA para AFB₁. Eixo X representa o log da concentração de AFB₁ e o eixo Y a % de ligação. LD = Limite de determinação, calculada através da média e 3 x desvio padrão dos valores de absorvância do controle negativo (0 ng/mL de AFB₁, 100 % ligação).

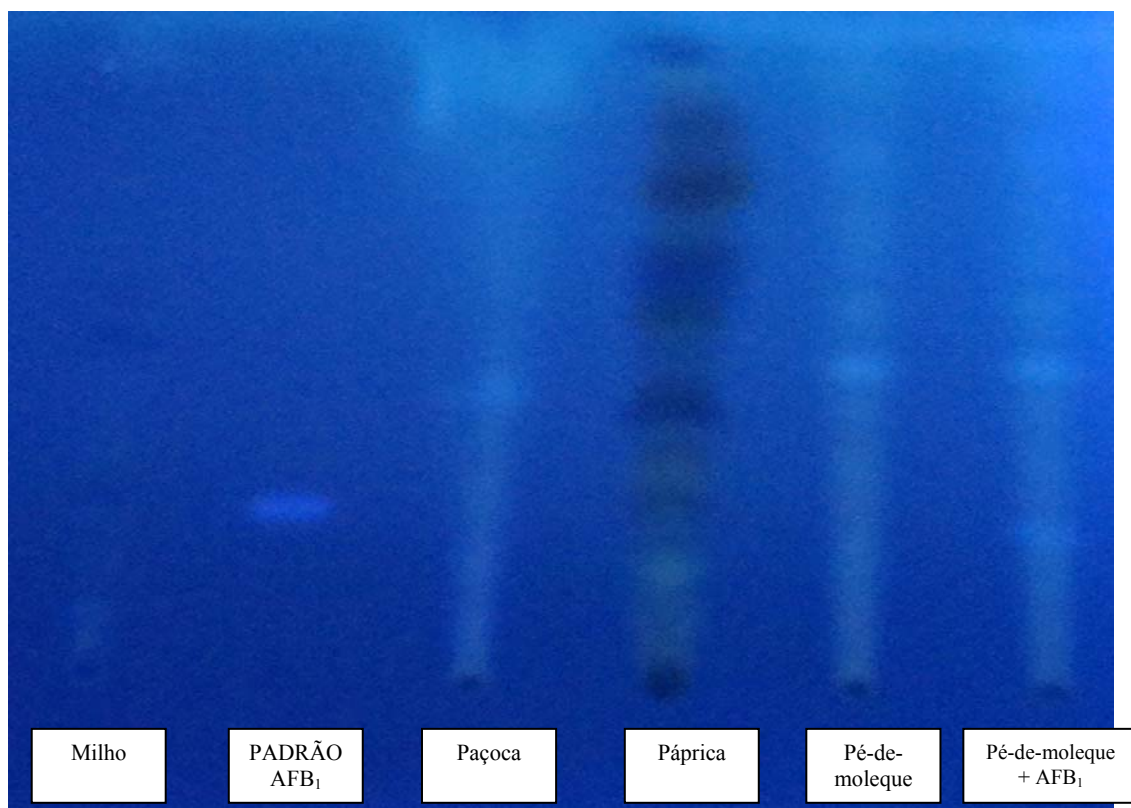


Figura 19 – CCD de amostras de páprica, paçoca, pé-de-moleque e milho, verificando negatividade perante AFB₁ e uma co-cromatografia da amostra de pé-de-moleque como AFB₁.

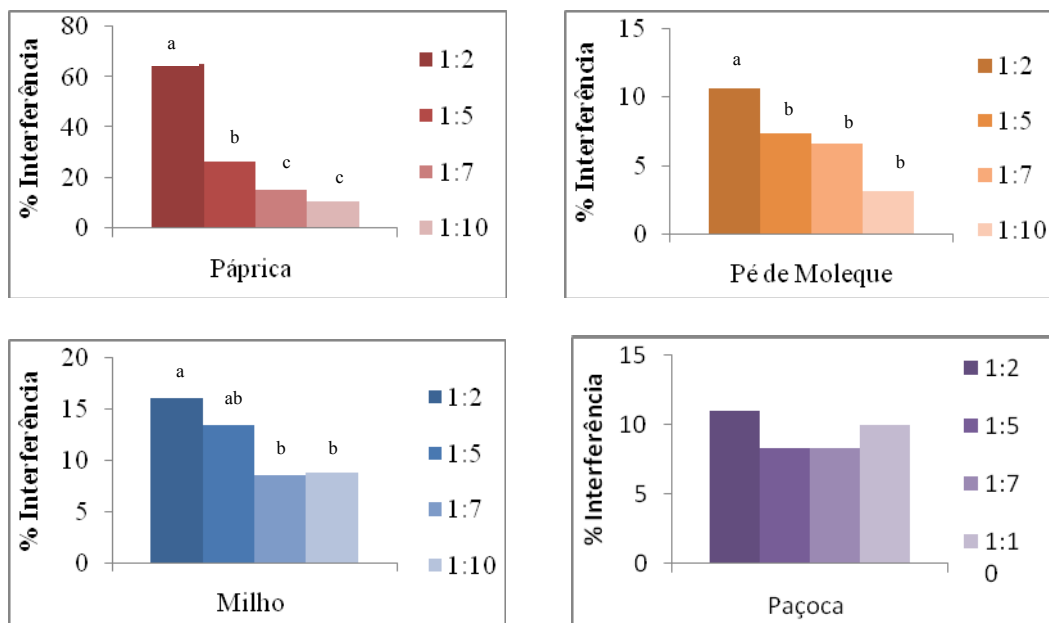


Figura 20 – Diluição de matriz alimentar visando redução da interferência na determinação de AFB₁ por ic-ELISA. Calculada pela fórmula $100 - (A+/A-) * 100$, em que cada dado consistiu de valores de duas repetições em duplicata.

Tabela 3 – Recuperação de AFB₁ em matrizes alimentares contaminados artificialmente com solução de 20 ng AFB₁/g.

	Recuperação ^a AFB ₁ (ng/g)		Média (ng/g)	Recuperação (%)	
				Total	Sem interferência da matriz
Páprica	43,035	83,296	63,165	315,83	186,69
Pé-de-moleque	19,873	18,738	19,306	96,53	82,25
Milho	26,922	13,896	20,409	102,04	90,55
Paçoca	24,046	19,165	21,606	108,03	81,15

^a médias de valores de duas repetições em triplicata

Tabela 4 – Determinação de AFB₁ em amostras de páprica, paçoca A3, paçoca A2, pé-de-moleque e milho por ic-ELISA.

Amostras	AFB ₁ (ng/g) ^a	Sem Interferência da matriz (ng/g)
Páprica A6	64,154	39,070
Páprica A7	43,764	26,382
Páprica A8	72,261	44,038
Paçoca A3	41,428	25,924
Paçoca A2	118,776	74,266
Pé-de-moleque A1	53,272	45,753
Milho A5	69,413	12,803
Milho K1373	19,794	12,803
Milho B	479,262	310,661

Tabela 5 – Estudo comparativo interlaboratorial de (a) determinação de AFB₁ em amostras de pé-de-moleque, paçocas, pápricas e milhos e (b) acrescido de concentração de AFB₂ quantificado Miyamoto (2007) e IAL (2007).

Comparação interlaboratorial de resultados obtidos de AFB ₁						
	MIYAMOTO, 2007		IAL, 2007	SILVA, 2007*		TAKABAYASHI, 2009
	CIA - HPLC	MFC - HPLC	HPLC	TLC	dc-ELISA (Neogem)	ic-ELISA
	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)
Pé-de-moleque A1	20,64	5,17	16	nr	nr	45,753
Paçoca A2	110,24	20,01	16	nr	nr	74,266
Paçoca A3	1,73	0,43	2,4	nr	nr	26,503
Páprica A6	0,72	nr	2,4	nr	nr	39,070
Páprica A7	8,72	nr	9,6	nr	nr	26,382
Páprica A8	9,55	nr	8	nr	nr	44,038
Milho A5	5,46	6,51	19,2	nr	nr	12,803
Milho K 1373	0,55	0,65	nr	3	3,78	12,803
Milho B	333,04	296,45	nr	nr	nr	310,661

* Determinação de Aflatoxinas totais.

CIA – HPLC: análise realizada empregando coluna de imunoafinidade seguida de detecção por HPLC.

MFC – HPLC: análise realizada empregando coluna multifuncional seguida de detecção por HPLC.

CCD: cromatografia de camada delgada.

dc-ELISA: ELISA competitivo direto (*kit* comercial)

nr: ensaio não realizado.

(a)

Comparação interlaboratorial de resultados obtidos de AFB1 + AFB2						
	MIYAMOTO, 2007		IAL, 2007	SILVA, 2007*		TAKABAYASHI, 2009
	CIA - HPLC	MFC - HPLC	HPLC	TLC	dc-ELISA (Neogem)	ic-ELISA
	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)
Pé-de-moleque A1	27,71	5,27	22	nr	nr	45,753
Paçoca A2	134,79	24,5	19,45	nr	nr	74,266
Paçoca A3	2,08	1,43	2,4	nr	nr	26,503
Páprica A6	0,72	nr	2,4	nr	nr	39,070
Páprica A7	8,72	nr	9,6	nr	nr	26,382
Páprica A8	9,55	nr	8	nr	nr	44,038
Milho A5	5,92	7,09	19,2	nr	nr	12,803
Milho K 1373	0,6	0,65	nr	3	3,78	12,803
Milho B	333,04	296,45	nr	nr	nr	310,661

* Determinação de Aflatoxinas totais.

CIA – HPLC: análise realizada empregando coluna de imunoafinidade seguida de detecção por HPLC.

MFC – HPLC: análise realizada empregando coluna multifuncional seguida de detecção por HPLC.

CCD: cromatografia de camada delgada.

dc-ELISA: ELISA competitivo direto (*kit* comercial)

nr: ensaio não realizado.

(b)

7 CAPÍTULO III – COLUNA DE IMUNOAFINIDADE DESENVOLVIDO COM AFFI-GEL 10 E ANTICORPO MONOCLONAL ANTIAFLATOXINA B₁ COMO BIOFERRAMENTA VISANDO DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE AFLATOXINAS

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

AcM antiAFB₁ – produzido em 100 % de H-SFM e 75 % de H-SFM adicionado ao RPMI+15 % de SFB foi combinado – empregando hibridoma linhagem AF2 (133 % de reatividade cruzada com AFB₂, gentilmente fornecido por Dr. Osamu Kawamura, *Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão*); AFB₁ padrão (cat. no. A6636), AFB₁-BSA (cat. no. A6655), albumina (Initial fractionation by cold alcohol precipitation ≥ 97 % albumin, cat. no. A4378), anticorpo IgG anti-*mouse*-HPR (cat. no. A4416), etanolamina-HCl (cat. no. 18674-0), ovalbumina (cat. no. A5378), glicina-etil-éster (cat. no. G650-3), reagente de Bradford (cat. no. B6916), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (TMB) (cat. no. T2885), peróxido de hidrogênio 30 % (cat. no. H1009), dimetilsulfóxido (DMSO) (cat. no. D260) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); microplaca de 96 orifícios (Corning, USA); *Activated Immunoaffinity Supports* Affi-Gel 10 (Bio-Rad, USA, cat. no.153-6046); coluna de prolipropileno (Muromac Columns, Muromachi Technos Co., Japão); placa de sílica para TLC – sílica gel 60 (Alugram® SilG, Macherey-Nagel, Alemanha); tubo de centrífuga de 15 mL (**BD Falcon™**, USA), metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA); água ultrapura (Purelab® Classic UF, Elga Labwater Global Operation, UK); tolueno, acetato de etila, ácido fórmico, clorofórmio graus P.A. (Synth, Brasil);); acetato de sódio (NaC₂H₃O₂.H₂O) (Mallinckrodt Inc., USA); agitador magnético (Fisatom, Brasil); banho a 50 °C; banho ultrassônico (Ultrasonic cleaner Unique, Brasil); centrifuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, 3805 03551, Alemanha); espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20 (GMB, Brasil); freezer (-85 °C) (CFC FREE, Sanyo, USA); homogeneizador de tubo (Lab Dancer S25, IKA® Work, Inc., Alemanha); peagâmetro (Digimed DM-22, Digicrom Analítica Ltda, Brasil); espectrofluorímetro (Varian, Cary-Eclipse, Australia); leitora de

ELISA (Bio-Tek Instruments ELX800, USA); Lâmpada de UV longo (modelo UVGL-15, Miralight Lamp, USA).

CONFECÇÃO DE CIA PARA DETECÇÃO DE AFB₁ EMPREGANDO ACM ANTIAFB₁

Affi-Gel 10 (*Activated Immunoaffinity Supports*, Bio-Rad) é um suporte de afinidade constituída de éster N-hidroxisuccinamida derivatizado ao gel de agarose, capaz de acoplar espontaneamente ao grupamento amina livre de anticorpo em solução aquosa ou não aquosa.

PREPARAÇÃO DA CIA AFFI-GEL 10: ACOPLAMENTO AQUOSO

AcM antiAFB₁ parcialmente purificado, utilizado no preparo de CIA foi proveniente do cultivo de hibridoma AF2 (*pool* do dializado pós-(NH₄)₂SO₄ do sobrenadante de cultivo em 100 % de H-SFM e 75 % de H-SFM adicionado ao RPMI+15 % de SFB). Affi-Gel 10 lavada três vezes com água ultrapura a 4 °C foi adicionada de AcM antiAFB₁ na proporção aproximada de 4 mg proteína/mL de gel (informação pessoal, Dr. Kawamura, *Kagawa University*). A confecção de CIA constituiu no total de 11 ensaios, agrupados em 3 experimentos (Exp.A, B e C, Figura 21), procedendo incubação por 18 h sob agitação lenta a 4 °C, ou 25 °C. Para o preparo de CIA 1, a mistura de Ac e suporte foi preparada diretamente na coluna. Para o preparo de CIA 2 a 9, a mistura de Ac e suporte foi preparada em tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugada (350 x g por 1 min a 4 °C). Os sítios ativos não acoplados, correspondentes a reação inespecífica, foram bloqueados com etanolamina-HCl 1,0 M pH 8,0 na proporção 1:1 de gel utilizado durante 1h a 25 °C, ou 2 h a 4 °C sob agitação lenta e o gel lavado 10 vezes com PBS. O gel acoplado foi suspenso em PBS contendo 0,02 % de azida sódica (NaN₃) e armazenada a 4°C. Para o ensaio, um volume de 0,5 mL de Ac-gel foi transferido para uma coluna de prolipropileno (Muromac Columns, Muromachi Technos Co., Japão) com o objetivo de testar a eficiência de ligação com AFB₁.

A eficiência de acoplamento de AcM foi analisado, procedendo leitura a 280 nm ou método de Bradford, assim como i-ELISA no sobrenadante pós-acoplamento, pós-bloqueio e pós-lavagem de coluna.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (IGG)

A concentração proteica (IgG) foi determinada pela leitura de absorvância a 280 nm, adotando coeficiente de absorção (E_{280}) de 1,35 para IgG (HARLOW & LANE, 1988b):

$$\text{Concentração IgG (mg/mL)} = \frac{\text{absorvância a 280 nm}}{\text{coeficiente de absorção}}$$

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

A concentração proteica foi determinada por método de Bradford (1976) sob forma de microensaio (microplaca com 96 orifícios). A curva padrão de proteína foi confeccionada empregando 10 μL de soro albumina bovina (BSA, Initial fractionation by cold alcohol precipitation $\geq 97\%$ albumin, Sigma, USA) nas concentrações de 31; 25; 62,5; 125; 175; 200; 250 $\mu\text{g/mL}$ (suspendida em PBS 0,015M pH7,3), tendo PBS como branco da reação. Um volume de 100 μL do reativo de Bradford foi adicionado à reação e após 15 min lida a 650 nm.

DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI AFB_1

IgG anti AFB_1 remanescente no sobrenadante pós-acoplamento, pós-bloqueio e pós-lavagem de coluna foi determinado por i-ELISA (Ensaio imunoenzimático indireto), seguindo essencialmente o protocolo descrito por Kawamura *et al.* (1988). As microplacas foram sensibilizadas com 100 μL de AFB_1 -BSA (100 ng/mL, tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1M pH 9,6) e incubadas a 4 °C por

18 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 200 μ L de solução ovalbumina a 0,1 % em PBS e incubadas por 1 h a 37 °C. Após 3 lavagens com PBST, adicionou-se 100 μ L de sobrenadante pós-acoplamento, pós-bloqueio e pós-lavagem a 25 °C por 1 h. Após 4 lavagens com PBST, adicionou-se 100 μ L de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* diluído a 1:10³ em PBST e incubadas a 25 °C por 1 h. Após 5 lavagens com PBST, adicionou-se 100 μ L da solução de substrato cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina) por 30 min a 25 °C . A reação foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄ 1M e a absorvância lida a 450nm.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO DE ACM À CIA AFFI-GEL 10

A eficiência de acoplamento do AcM antiAFB₁ ao suporte Affi-Gel 10 foi estimado empregando equação abaixo (GAO *et al.*, 1998):

$$\text{Eficiência de Acoplamento} = \frac{V_0 A_0 - V_E (A_E - A_{E0})}{V_0 A_0} \times 100\%$$

Onde:

A₀, A_E, A_{E0} são valores de absorvância correspondente à proteína total antes do acoplamento, sobrenadantes pós-acoplamento somado ao do pós-bloqueio, e tampão de acoplamento (PBS), respectivamente, obtido pela leitura direta a 280 nm, ou a 650 nm pelo Método de Bradford.

V₀ e V_E representam os volumes correspondentes à solução inicial de proteína e efluente de proteína não-ligada.

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE AFB₁ EM CIA AFFI-GEL 10

A capacidade da retenção de AFB₁ na coluna foi testada, pipetando 5 mL de solução de AFB₁ (10 ng/mL, 2,5 % de metanol em PBS) em CIA previamente acondicionada com PBS (10 mL). Em seguida, a coluna foi lavada com 15 mL de PBS e

AFB₁ eluída em 5 frações sequenciais de metanol grau CLAE (2 mL por fração), sob fluxo de 1-2 gotas/s a 25° C. O eluato correspondente a cada fração foi seco sob fluxo de N₂ gasoso e presença de AFB₁ visualizada por cromatografia de camada delgada (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996).

DETERMINAÇÃO DE AFB₁ POR CROMATOGRÁFIA DE CAMADA DELGADA

O resíduo seco, correspondente a cada fração oriundo de CIA, foi ressuspendido em 200 µL de metanol. Uma alíquota de 40 µL foi aplicada em placa de sílica gel juntamente com 10 µL solução padrão de AFB₁ (1 µg/mL). O cromatograma foi desenvolvido com a fase móvel tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (60:40:0,1, v/v/v) e analisado sob UV longa.

DETERMINAÇÃO DE AFB₁ POR ESPECTROFLUORIMETRIA

O resíduo foi ressuspendido em 300 µL de metanol. Uma alíquota de 125 µL de amostra foi adicionado de 125 µL de revelador (solução aquosa de bromo 0,003 %, v/v) e após 60 s, procedeu-se leitura em 360 nm de excitação e 420 nm de emissão (espectrofluorímetro Cary-Eclipse, Varian, Australia), conforme padronizado por HAYASHI (2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme recomendação geral, o acoplamento aquoso de proteína ao suporte ativo Affi-Gel 10 deve proceder em tampão MÊS, MOPS, HEPES, POPSO, acetato ou bicarbonato sob agitação a 4 °C por 4 h de preferência, ou a 25 °C por 1h. Para acoplamento emprega-se acima de 25 mg de proteína por mL de suporte ativo. Aliado a isso, o volume da solução proteica deve ser mantido entre 1,5 a 4,5 mL / mL de gel (manual do fabricante, BIO-RAD LABORATORIES, 2000).

Para o nosso experimento empregou-se o AcM produzido pelo hibridoma AF2 no meio de 75 e 100 % H-SFM, precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dialisado em PBS 0,1 M pH 7,3 e H_2O ultrapura. A quantidade de proteína foi reduzido para 4 mg por mL de gel (KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*; MIYAMOTO, 2007).

No total foram confeccionadas 11 CIAs (Figura 22 e 23), obtendo resultados de eficiência de acoplamento diferentes (Tabela 6), assim como devido a resultados negativos foram testados alterações no processo de acoplamento.

A CIA 1 foi confeccionada realizando processo de acoplamento, bloqueio e lavagem na coluna. Em estudo anterior relatou-se baixa eficiência da coluna devido a ligações inespecíficas do suporte com interferentes de matrizes alimentares (FUJII, 2007). Portanto, para o bloqueio de sítios inespecíficos testou-se etanolamina-HCl 1,0M (pH 8,0), glicina-etil-éster 1,0M (pH 8,0) (BIO-RAD LABORATORIES, 2000) e BSA a 5 % em 0,01M PBS (XIULAN *et al.*, 2006). Assim, a CIA 1 foi dividida em CIA 1A (etanolamina-HCl), CIA 1B (glicina-etil-éster) e CIA 1C (BSA) e cada coluna foi eluída 3 vezes com metanol grau HPLC (10 mL cada fração) e quantificada por espectrofluorimetria (Tabela 7). Os resultados superestimaram a quantidade de toxina adicionada (3935 % a 8014,6 % de recuperação), indicando ineficiência das CIAs confeccionadas, repetindo o insucesso anterior (HAYASHI, 2007).

Tendo em vista a dificuldade em proceder todo processo dentro da coluna (Figura 21, Exp.1), principalmente devido ao rompimento do filtro e consequente perda de recheio Ac-Gel, as CIAs 2 a 9 foram confeccionadas com a mistura de Ac-Gel previamente preparado em tubo tipo Falcon de 15 mL.

A concentração proteica em sobrenadante obtido de CIA 1, 2, 3 e 4 foi determinada a 280 nm, conforme manual do fabricante. Porém, a baixa eficiência de acoplamento em CIA 2 e 3 (-8,03 e 10,1 %, respectivamente), indicada pela leitura em 280 nm, demonstrou Affi-Gel 10 em dissolução nos sobrenadantes, causando absorção neste comprimento de onda e superestimando a leitura de proteína não acoplada. Para contornar o problema, a determinação de proteína em sobrenadante oriunda de CIA 5 a 9 foi realizada pelo método de Bradford.

CIA 4 e 5 apresentaram negatividade na eluição de AFB_1 passada pela coluna, não sendo visualizada na placa cromatográfica (CCD) banda azul sob luz UV. Uma das possíveis explicações é o armazenamento inadequado do Affi-Gel 10. O

fabricante informa que pode armazená-lo a -20 °C por 1 ano ou -70 °C por 1,5 ano mantendo pelo menos 80 % da atividade sendo que, ao ser adquirido, foi estocado no laboratório a -20 °C em torno de 1 ano, sem considerar o período anterior ao tempo de transporte até o laboratório. Assim, o gel utilizado provavelmente perdeu a atividade de acoplamento a proteína.

CIA posteriores foram confeccionadas com Affi-Gel 10 recém adquiridos e armazenados a -85 °C. CIA 6 apresentou porcentagem de eficiência de acoplamento relativamente baixo (52,5 %). Ao verificar por CCD, a toxina foi eluída no metanol, obtendo-se resultado negativo, não sendo visualizada a banda azul. O motivo de não lograr êxito está na hipótese que a coluna foi acondicionada em metanol, H₂O ultrapura e PBS, e a solução em que continha AFB₁ ter sido feita com metanol: PBS (1:9, v/v). Kondo *et al.* (2000) acondicionou CIA confeccionada com Affi-Gel 10 e AcM antimicrocistina com PBS, metanol e água destilada. No ensaio, contudo, o solvente pode ter afetado a ligação do Ac ao suporte ativo, desfazendo o acoplamento (KONDO *et al.*, 2002). Desse modo, foi retirada a etapa de acondicionamento com metanol e o padrão de AFB₁ foi diluído em 2,5 % de metanol em PBS.

Pelos resultados obtidos anteriormente, foram testadas outras condições de acoplamento (Figura 21, Exp. 2 e 3) na tentativa de melhorar a porcentagem de eficiência de acoplamento e na retenção da toxina pelos anticorpos imobilizados ao suporte.

CIA 7 foi preparada de forma similar aos anteriores alterando a concentração de metanol da solução de AFB₁ (2,5 % metanol). Na CIA 8, alterou-se a temperatura de acoplamento (25 °C), apesar do manual recomendar a reação a 4 °C. Miyamoto (2007) desenvolveu a CIA na temperatura a 25 °C, alcançando 94 a 105 % de taxa de recuperação de aflatoxinas em amostras de milhos, utilizando CIA como etapa de limpeza e concentração, sendo determinado por CLAE. Na CIA 9 foi modificada a temperatura de bloqueio (4 °C) e também o AcM foi liofilizado e resuspenso em PBS 0,1 M pH 7,3.

As CIA 7, 8 e 9 apresentaram retenção da toxina por CCD (Figura 24), sendo a eluição da toxina obtida na primeira fração do metanol (nos primeiros 2 mL). Não se consegue distinguir qual das 3 colunas reteve mais toxina, sendo necessário outro método analítico para obter quantificação e assim saber qual preparo é mais eficiente, tanto no acoplamento quanto na retenção de toxina.

As 2 primeiras frações de metanol apresentaram-se esbranquiçadas e compactas após a secagem, sendo mais evidente na primeira fração (Figura 25). Provavelmente, o suporte ativo não compactado passou pelo filtro que a coluna possui, sugerindo-se uma pré-filtragem para quantificação de AFB₁.

No i-ELISA para todos os sobrenadantes das etapas do preparo da coluna (pós-acoplamento, pós-bloqueio e pós-lavagem) apresentaram resultados positivos, indicando que nessas soluções ainda havia anticorpo. Miyamoto (2007) obteve na solução pós-bloqueio resultado negativo de atividade de anticorpo por i-ELISA. Nas próximas tentativas de confecção de CIA deve-se aperfeiçoar o processo de acoplamento, tentando acoplar mais anticorpo ao suporte.

CONCLUSÃO

A confecção de CIA visando limpeza e concentração de extratos de amostras para análise de AFB₁ foi laborioso, exigindo-se atenção em todas as etapas. Os resultados obtidos indicam que CIA com melhor resultado de acoplamento pode ser alcançado concentrando o IgG produzido e preparando a 4 °C. Devem-se prosseguir os estudos para desenvolvimento de CIA, analisando: melhor método de preparo da coluna, solução de bloqueio, redução do uso de metanol para eluição da toxina, estabelecimento de uma filtragem do eluato ressuspendido ou otimização do filtro da coluna e ensaios de validação. Assim como, deve-se padronizar o espectrofluorímetro a fim de aumentar a sensibilidade de detecção, facilitar e agilizar a análise.

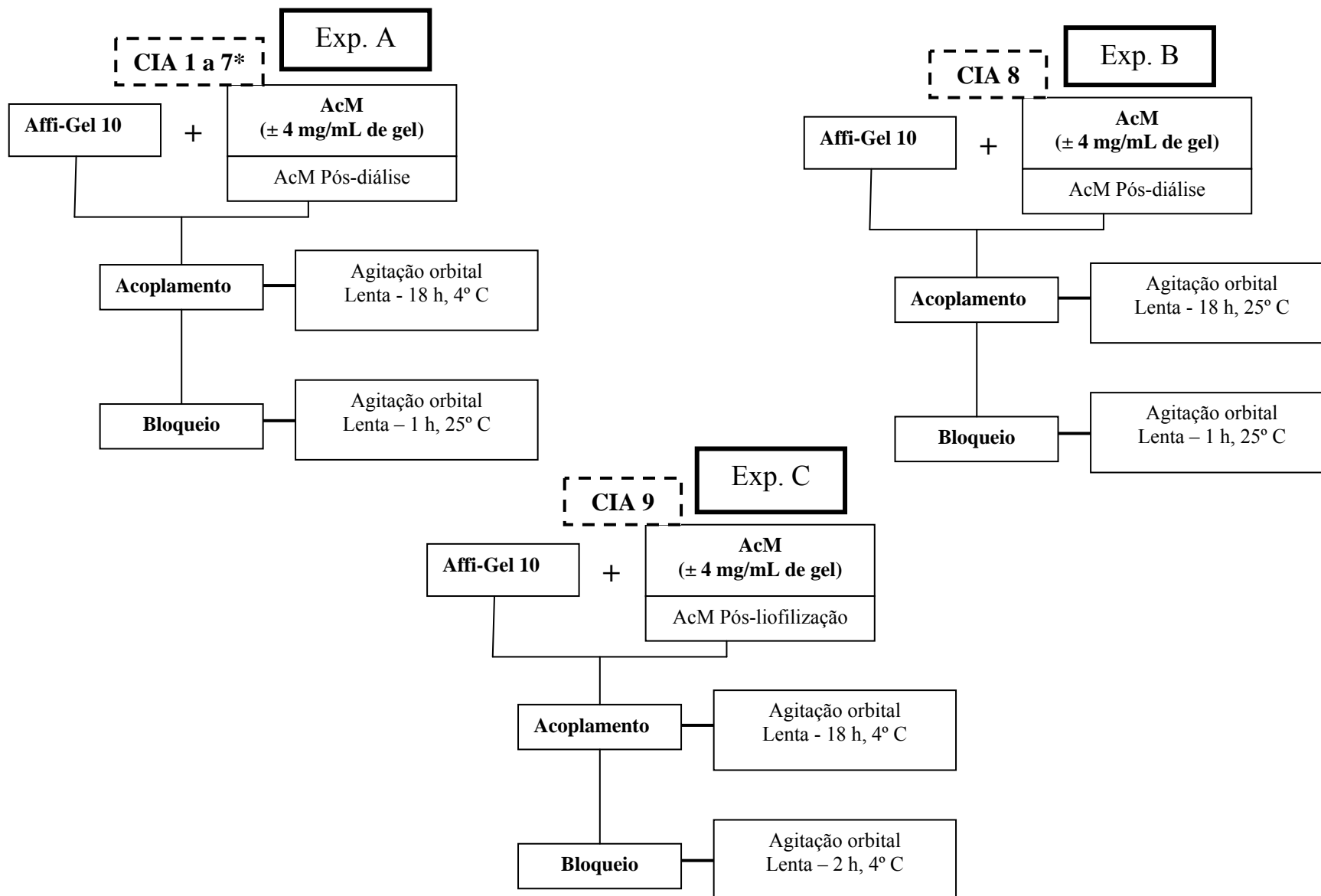


Figura 21 – Esquema para confecção de CIA visando análise de AFB1, diferenciando a concentração de AcM, temperatura de acoplamento, temperatura e tempo de bloqueio com etanolamina-HCl 1 M pH 8,0. * CIA 1: acoplamento de Ac-Gel na coluna; CIA 2 a 7: acoplamento de Ac-Gel em tubo tipo Falcon de 15 mL.

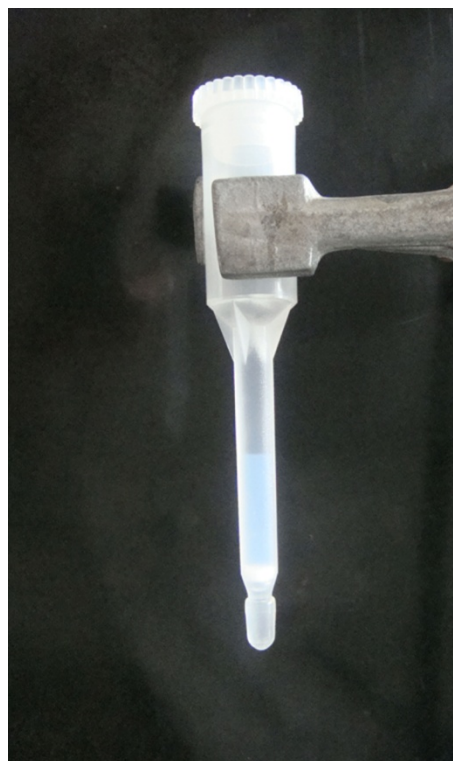


Figura 22 – CIA confeccionada com antiAFB₁ acoplada a 0,5 ml de Affi-Gel 10.

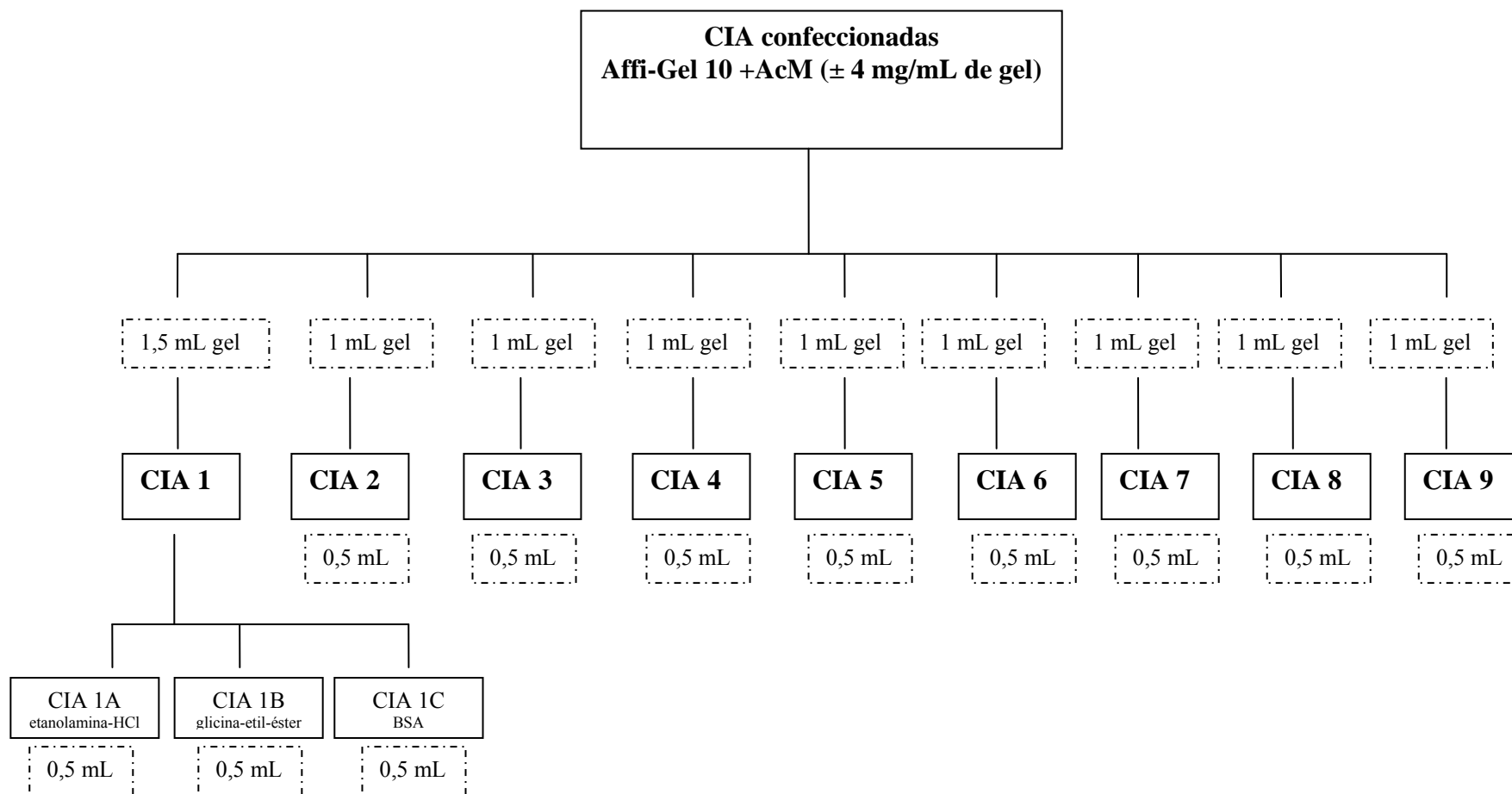


Figura 23 – Esquema da confecção das CIAs (11 colunas) visando limpeza e concentração de AFB₁.

Tabela 6 - Eficiência do acoplamento de IgG antiAFB₁ (%) ao Affi-Gel 10 em CIA confeccionada.

	CIA 1 ^{a*}	CIA 2 ^a	CIA 3 ^a	CIA 4 ^b	CIA 5 ^b	CIA 6 ^b	CIA 7 ^b	CIA 8 ^b	CIA 9 ^b
Eficiência de acoplamento (%)	74,68	-8,03	10,1	63,04	54,51	52,5	60,13	62,95	80,61

^a Determinação de proteína pela absorvância a 280 nm

^{a*} Determinação proteína pela absorvância a 280 nm de gel acoplado que foi dividida em 3 colunas com diferentes soluções de bloqueios

^b Determinação de proteína pelo Método de Bradford

Tabela 7 - Teste de recuperação de AFB₁ com 10 ng/mL (3 mL) com CIA confeccionadas com suporte Affi-Gel 10 e AcM antiAFB₁, bloqueada com etanolamina-HCl 1,0 M (pH 8,0), glicina-etil-éster 1,0 M (pH 8,0) ou BSA a 5 % em 0,01M PBS e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

CIA 1	AFB ₁ recuperada (ng)	Recuperação (%)	Recuperação total (%) (soma das frações)
CIA 1A - fração 1	592,68	1975,60	3935,00
CIA 1A - fração 2	290,00	966,67	
CIA 1A - fração 3	297,82	992,73	
CIA 1B - fração 1	1264,82	4216,07	7467,97
CIA 1B - fração 2	631,42	2104,73	
CIA 1B - fração 3	344,15	1147,17	
CIA 1C - fração 1	1287,43	4291,43	8014,60
CIA 1C - fração 2	799,92	2666,40	
CIA 1C - fração 3	317,03	1056,77	

CIA 1A : solução bloqueio etanolamina-HCl 1,0 M (pH 8,0)

CIA 1B : solução bloqueio glicina-etil-éster 1,0 M (pH 8,0)

CIA 1C: solução bloqueio BSA a 5 % em 0,01M PBS

fração 1, 2 e 3 são as frações de metanol coletadas na eluição da CIA (10 mL de metanol cada)

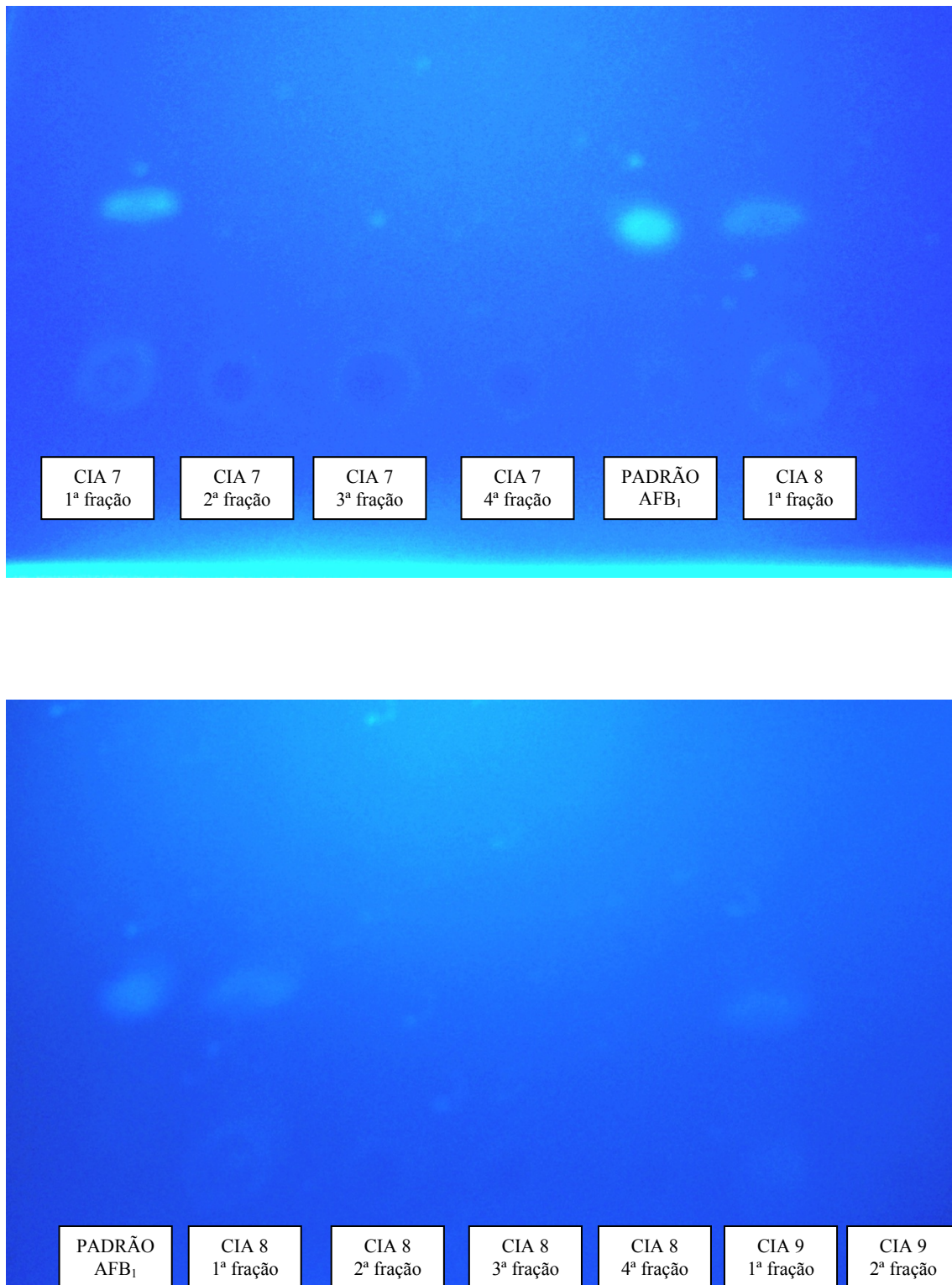


Figura 24 – Visualização sob luz UV do CCD das principais fração de metanol eluído das CIA 7, 8 e 9, e do padrão de AFB₁ para comparação.



Figura 25 – Aspecto esbranquiçado e compacto da 1^a e 2^a fração de eluição com metanol da CIA confeccionada.

REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, H. et al. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using multifunctional column clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 932, p. 153-157, 2001.
- ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 13, p. 173-183, 2002.
- ARAÚJO, J. M. A. **Aflatoxinas: aspectos químicos e biológicos**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1990.
- ARDIC, M. et al. Determination of aflatoxin B₁ levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1596-1599, 2008.
- AYBAY, C.; IMIR, T. Development of a rapid, single-step procedure using protein G affinity chromatography to deplete fetal calf serum of its IgG and to isolate murine IgG1 monoclonal antibodies from supernatants of hybridoma cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 233, p. 77-81, 2000.
- BAICU, S. C.; TAYLOR, M. J. Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. **Cryobiology**, v. 45 n. 1, p. 33-48, 2002.
- BERTHILLER, F. et al. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. No prélogo. **International Journal of Food Microbiology**, 2007.
- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 265-282, 2007.
- BIO-RAD LABORATORIES. **Activated Immunoaffinity Supports**. Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, 2000.
- BIRCH, J.; RACHER, A. Review: Antibody production. **Advanced Drug Delivery**, v. 58, p. 671-685, 2006.

BOENISCH, T. Antibodies. In: BOENISCH, T. **Handbook Immunochemical Staining Methods**. 3. ed. California: DAKO Corporation, 2001. p. 5-11.

BRADBURN, N.; COKER, R. D.; BLUNDEN, G. A comparative study of solvent extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid phase columns on the determination of aflatoxin B₁. **Food Chemistry**, v. 52, p. 179-185, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 248-54, 1976.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2002. **Resolução RDC nº274**. Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho, constante do anexo desta Resolução. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1653>> Acesso em: 18 ago. 2007.

CALLERI, E. et al. Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B₁ in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 396–403, 2007.

CANDLISH, A. A. G; SMITH, J. E.; STIMSON, W. H. Monoclonal antibody for micotoxins. **Biotechnology Advances**, v. 7, p. 401-418, 1989.

CARLSON, M. A et al. An automated, handheld biosensor for aflatoxin. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 14, p. 841–848, 2000.

CAVALIERE, C. et al. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 141–148, 2007.

CHIAVARO, E. et al. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 31-40, 2001.

CHO, S. H. et al. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry**, v. 107 p. 1283–1288, 2008.

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

COULOMBE, R. A. J. R. Biological Action of Mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 3, p. 880-891, 1993.

COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) nº1881/2006** de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2006/l_364/l_36420061220pt00050024.pdf> Acesso em: 18 ago. 2007.

COMITÊ DA UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) nº401/2006**, 2006 de 23 de Fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:PT:PDF>> Acesso em: 13 fev. 2009.

CUCCI, C.; MIGNANI, A.G.; DALL'ASTA, C.; PELA, R.; DOSSENA, A. A portable fluorometer for the rapid screening of M1 aflatoxin. **Sensors and Actuators B**, v. 126, p. 467-472, 2007.

DALY, S. J. et al. Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B₁. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5097-104, 2000.

DELMULLE, B. S., S. M. de et al. Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B₁ in pig feed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3364-3368, 2005.

DEVI, K. T. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B₁. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 248-288, 1999.

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

EDINBORO, L. E.; KARNES, H. T. Determination of aflatoxins B₁ in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extraction coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 127-132, 2005.

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

FERNÁNDEZ-IBAÑEZ, V. et al. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B₁ in maize and barley as analytical quality assessment. **Food Chemistry**, n. 113, p. 629–634, 2009.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 25 n. 2, p. 172-180, 2008.

FRUTOS, M. Chromatography-immunology coupling, a powerful tool for environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, n. 3, 1995.

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

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

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

GAO, Y. et al. (ed.), **Contemporary Immunological Technology and Application, Chinese Academy of medical Sciences**. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1998, p. 309.

GORYACHEVA, I. U. et al. Simultaneous non-instrumental detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A using a clean-up tandem immunoassay column. **Analytica Chimica Acta**, v. 590, p. 118–124, 2007.

GROOPMAN, J. D. et al. High-affinity monoclonal antibodies for aflatoxin and their application to solid-phase immunoassays. **Biochemistry**, v. 81, p. 7728-7731, 1984.

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

HARLOW E., LANE D. Protein Techniques. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 673, 1988 (b).

HARLOW E., LANE D. Storing and Purifying antibodies. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 245-281, 1988 (c).

HAYASHI, L. **Anticorpo monoclonal anti-AFB₁**: coluna de imunoafinidade e espectrofluorimetria para controle de qualidade de alimentos, 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

HEFLE, S.L. Immunoassay Fundamentals. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 102-107, 1995.

HEILMANN, K. et al. Modulation of hybridoma cell growth and antibody production by coating cell culture material with extracellular matrix proteins. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 301–308, 2007.

HEILMANN, K. et al. The influence of the chemical composition of cell culture material on the growth and antibody production of hybridomas cells. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 291-301, 2005.

HEUSSNER, A. H. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against ochratoxin B. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 827–833, 2007.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

HOLTZAPPLE, C. K. et al. Characterization of monoclonal antibodies to aflatoxin ml and molecular modeling studies of related aflatoxins. **Molecular Immunology**, v. 33. n. 11/12, p. 939-946, 1996.

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

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

INSTITUTO ADOLF LUTZ (IAL). Resultado da análise de milho, páprica, paçoca e pé-de-moleque A5 por HPLC. São Paulo, 2007.

IP, S. P; CHE, C. T. Determination of aflatoxins in Chinese medicinal herbs by high-performance liquid chromatography using immunoaffinity column cleanup Improvement of recovery. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 241–244, 2006.

JAIMEZ, J. et al. Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 1-10, 2000.

KAWAMURA, O. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B₁ in peanut products. **Mycotoxin Research**, v. 4, p. 75-87, 1988.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256 n. 5517, p. 495-497, 1975.

KOLOSOVA, A. Y. et al. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 286-294, 2006.

KONDO, F. et al. Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water. **Toxicon**, v. 38, p. 813-823, 2000.

KONDO F. et al. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. **Toxicon**, v. 40, p. 893-899, 2002.

KOS, G.; LONNGER, H.; KRŠKA, R. Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. **Vibrational Spectroscopy**, v. 29, p. 115-119, 2002.

KRŠKA, R. et al. Mycotoxin analysis: An update. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 152-163, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, N. A. et al. A rapid aflatoxin B₁ ELISA: Development and Validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2746-2755, 2004.

LEGAZPI L. et al. Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: substrate and agitation effects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 122-130, 2005.

MAIER, N. M. et al. Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 103-111, 2004.

MARAGOS, C. M. et al. Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 164-171, 2008.

MIYAMOTO, K. **Estudo de utilização de técnica de coluna de imunoafinidade na determinação de aflatoxina em milho e amendoim**. 2007. 104 p. Tradução por Hiromichi Takabayashi. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Bioquímica e Ciência de Alimentos, Faculdade de Agricultura, Universidade de Kagawa, Japão.

MUSCARELLA, M. et al. Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, p. 257-264, 2007.

NAKAJIMA, M. et al. Determination of Ochratoxin A in Coffee Beans and Coffee Products by Monoclonal Antibody Affinity Chromatography. **Food & Agricultural Immunology**, v. 2, p. 189-195, 1990.

NICHOLAS W. et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632 n. 2, p. 168-180, 2009.

OKESON, C. D; RILEY, M. R. Glutamine replenishment and ammonia and ammonia removal in hybridoma cell cultures via immobilized glutamine synthetase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9 n. 2, p. 125-133, 2001.

ONO, E. Y. S. et al. Micotoxinas em alimentos: Progressos na imunodectecção. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 69-80, 2004.

ONO, E. Y. S. et al. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5-14, 2000.

ORSI, R. B. et al. Effects of oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Chemico-Biological Interactions**, v. 170, n. 3, p. 201-208, 2007.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture. 1. Analysis of data from controlled batch reactors, **Biotechnology Progress**, v. 7, p. 471-480, 1991.

PITTET, A. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 96, p. 424-444, 2005.

POLYCHRONAKI, N. et al. Urinary biomarkers of aflatoxin exposure in young children from Egypt and Guinea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 519-526, 2008.

PRIETO-SIMÓN, B.; NOGUER, T.; CAMPÀS, M. Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 689-702, 2007.

R-BIOPHARM GMBH, Darmstadt, Alemanha. RIDASCREEN® Aflatoxin Total Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxins. Art No.: R4701. Disponível em: <http://www.scti.co.jp/medical/PdfFiles/rbo/Aflatoxin_total.pdf> Acesso em: 12 dez. 2008.

R-BIOPHARM RHÔNE Ltd. Disponível em: <<http://www.r-biopharmrhone.com/pro/myco.html>> Acesso em: 18 ago. 2007.

RHEMREV-BOOM, M. M. et al. (Immuno)affinity chromatography: a versatile tool for fast and selective purification, concentration, isolation and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 825-833, 2001.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997.

SAHA, D. et al. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in chili samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p. 343-349, 2007.

SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v. 13, p. 87-92, 2002.

SANCHEZ, F. G. et al. Development and characterisation of an immunoaffinity chromatographic column for the on-line determination of the pesticide triclopyr. **Talanta**, v. 71, p. 1411-1416, 2007.

SAPSFORD, K. E. et al. Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B₁ in corn and nut products using the array biosensor. **Biosensors and Bioelectronics.**, v. 21, n. 12, p. 2298-2305, 2006.

SCHNERR, H.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. A Biosensor-based Immunoassay for Rapid Screening of Deoxynivalenol Contamination in Wheat. **Food and Agricultural Immunology**, v. 14, n. 4, p. 313-321, 2002.

SILVA, M. **Avaliação da presença de fungos e micotoxinas na tecnologia de pós-colheita do milho.** 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUES-AMAYA, D. B., Métodos para determinação simultânea de aflatoxina B e G, ocratoxina A, zearalenona e ivermectina.
Procedimento Operacional Padronizado. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz. 1996.

STROKA, J.; ANKLAM, E. New strategies for the screening and determination of aflatoxin-producing moulds in food and feed. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 90-95, 2002.

STROKA, J.; ANKLAM, E. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 904, p. 263-268, 2000.

STROKA, J.; VAN OTTERDIJK, R.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 904, p. 251-256, 2000.

SYLLA, A.; DIALLO, M. S.; CASTEGNARO, J. J.; WILD, C. P. Interactions between hepatitis B virus infection and exposure to aflatoxins in the development of hepatocellular carcinoma: a molecular epidemiological approach. **Mutation Research**, v. 28, p. 187-196, 1999.

TANAKA, K. et al. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 59-66, 2007.

TAVČAR-KALCHER, G. et al. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B₁ in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. **Food Control**, v. 18, p. 333-337, 2007.

TINTÓ, A. et al. The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 95 , p. 205–214, 2002.

TIZARD, I. R. **Immunology: an introduction**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1995.

TOMA, H. E. Nanotechnology and nanosciences: concepts, challenges and perspectives in Brazil. **Proceedings of the Symposium Brazil-Japan in Economy, Science and Technological Innovation**. São Paulo-SP, Brazil, 14-16 June 2008.

UENO, Y. et al. ELISA of mycotoxins with monoclonal antibodies. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v. 31, supl., p. 80-89, set. 1987.

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

XIAO, H. et al. Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2092-2097, 1995.

XIULAN, S. et al. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B₁ in foods. **Food Control**, v. 17, p. 256-262, 2006.

XIULAN, S. et al. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B₁. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 185-194, 2005.

WEWETZER, K.; DILMAGHANI, K. Exposure to dimethyl sulfoxide at 37 °C prior to freezing significantly improves the recovery of cryopreserved hybridoma cells. **Cryobiology**, v. 43, p. 288-292, 2001.

ZOLA, H.; BROOKS, D. Techniques for production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies. In: HURRELL, J. G. R. **Monoclonal hybridoma antibody: techniques and applications**. CRC Press, 1982. p. 4-54.