



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SIMONE FUJII

**MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE
OCRATOXINA A, PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTE E
APLICAÇÃO EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES**

Londrina
2007

SIMONE FUJII

**MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE
OCRATOXINA A, PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTE E
APLICAÇÃO EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2007

SIMONE FUJII

**MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE
OCRATOXINA A, PRODUÇÃO DE IMUNORREAGENTE E
APLICAÇÃO EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Profa. Dra. Vildes Maria Scussel

Prof. Dr. Carlos Kemmelmeier

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de
Oliveira

Londrina, 26 de Janeiro de 2007.

A Deus, pela força, coragem e saúde para a realização deste trabalho;
Aos meus pais, Ivone e Akira, e minhas irmãs Mônica e Patrícia, pelo incentivo,
amor e esforços realizados para que eu alcançasse tal objetivo, estando sempre
presentes durante toda essa caminhada, eternamente grata;
Ao Ricardo, por todo amor e compreensão, apoio e dedicação nos momentos mais
difíceis, sendo fundamental para minha vida e concretização desta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela incansável orientação, dedicação, incentivo e paciência, sem os quais este trabalho não seria possível;

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos preciosos ensinamentos e colaboração durante o desenvolvimento do curso de doutorado;

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa – CNPq, pela concessão da Bolsa de Doutorado e apoio financeiro;

À Fundação Araucária, FINEP, Fundo SETI pelo apoio financeiro;

Ao Dr. Osamu Kawamura de Kagawa University, Japão, pelo fornecimento de hibridomas anti-micotoxinas, pela orientação e valiosas informações a respeito de produção de reagentes imunológicos, sem os quais o trabalho não seria possível;

Ao Dr. Yoshio Ueno de Science University of Tokyo, Japão, pela doação de anticorpos monoclonais anti-OTA;

Aos membros titulares da banca examinadora, Dra. Vildes M. Scussel, Dr. Carlos Kimmelmeier, Dra. Eiko N. Itano e Dra. Tereza Cristina R. M. Oliveira, pelas valiosas sugestões que contribuiram para o aprimoramento desta Tese;

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela orientação e auxílio no desenvolvimento técnico, utilização do laboratório de imunotécnica para a execução do cultivo e manutenção de hibridomas, assim como para a produção de imunorreagentes;

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela orientação, apoio, prontidão e ensinamentos no desenvolvimento deste trabalho e utilização do equipamento de CLAE no Departamento de Bioquímica-UEL;

À Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira pela colaboração, prontidão e empréstimo de material e equipamentos necessários ao cultivo de células;

Aos Profs. Dra. Maria Helena P. Fúngaro e Dr. Cássio Egídio Prete, Instituto Agrônomo do Paraná–IAPAR e pesquisadora Maria Brígida dos Santos Scholz, pelo fornecimento de amostras de café para execução do trabalho;

Aos Profs. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gómez e Dr. Mário Augusto Ono, pela colaboração;

À Profa. Dra. Lourdes Botelho Garcia pelo estímulo, apoio e orientação prestada desde a Graduação, sendo uma grande amiga e orientadora;

Ao Doutor e amigo Alexandre Rodrigo Coelho, pelo auxílio, dedicação, companheirismo e alegria durante todo o trabalho e, sobretudo amizade;

Às amigas Alessandra Braga Ribeiro e Luciana Hayashi, pelo auxílio prestado no cultivo de células e produção de anticorpos, colaboração, alegria e amizade;

Ao amigo Flávio Itano, pela ajuda, colaboração e dicas nos experimentos de cultivo celular;

Aos amigos queridos Elisabete Hiromi Hashimoto, Adriana Pereira da Silva, Cláudio Takeo Ueno e Marcelo Silva, pela preciosa colaboração, apoio, companheirismo, dicas e, sobretudo, amizade.

Aos alunos Cássia Reika Takabayashi, Fernando Fracão e Jorge Augusto Campaner, pelo auxílio como estagiários;

A todos os funcionários e técnicos do Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial à Maria Alice, Alessandra, Marli, Irene, Sandra Rezende, Berenice e Elza Youssef por sempre me ajudarem quando precisava, e à Célia pela ajuda, carinho e amizade durante toda esta etapa;

À Patrícia Sambatti, pela prontidão, disposição, auxílio e amizade;

Aos pós-graduandos e funcionários do Depto. Ciências Patológicas, em especial à Fernanda, Mari, Nilson e Nilton pela grande ajuda e colaboração;

Aos funcionários e técnicos do Depto. Bioquímica, em especial ao Nilson;

Aos amigos e colegas Marcos Giovani Celli, Valéria Garcia Pereira, Laisiane da Nóbrega, Caroline Maria Calliari, Anié Francabandiera, Joice Sifuentes dos Santos, Letícia Schiavo, Luciana Bernd, Neusa Seibel, Lyssa Sakanaka, Elaine Cunha Moreno, Alexandre Morey, Elvis Perboni, Alexandre Sasaki, Daniel, Marcela Frata, Luis Rodrigo, Rafael Dias, Josimeire, Fernando Basso, Ana Augusta, Luciane, Michele, Márcio, Denis, Miriam, Carmen, Silvana, Marly, Maira Reche e Arlete Reche pela alegria, companheirismo e momentos de descontração, tornando mais suaves os dias mais difíceis;

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

Ao meu noivo Ricardo Marcelo Reche Ribeiro, pela colaboração, presença constante, apoio, paciência, amizade e felicidade proporcionados e, principalmente pelo amor dedicado;

À Mônica, Patrícia, Thaís, Daniele e Cláudio pelo incentivo, colaboração, amizade, alegria e amor dedicados;

Aos meus amados Pais, Ivone e Akira, por todo o carinho, exemplo, amor, dedicação e esforços realizados para a minha formação profissional.

FUJII, Simone. **Métodos imunoquímicos para detecção de ocratoxina A, produção de imunorreagente e aplicação em diferentes matrizes alimentares.** 2007. 119f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

O monitoramento visando controle de ocratoxina (OTA) no sistema agroalimentar requer métodos analíticos eficientes, devendo-se estimular a produção de reagentes para o desenvolvimento de metodologia acessível à condição nacional. A produção de imunorreagentes específicos, associada ao desenvolvimento de ensaios imunoquímicos possibilitaria aos laboratórios de controle de qualidade o acesso a metodologias que auxiliariam na prevenção da contaminação e conseqüentemente no fornecimento de alimentos mais seguros. Assim, ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) baseado em anticorpo monoclonal (AcM) anti-OTA.7 foi desenvolvido e seu desempenho comparado mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise de 68 amostras de café da região Norte do Estado do Paraná (safra 2003) demonstrou confiabilidade e eficiência de ic-ELISA, sendo o coeficiente de correlação com CLAE de 0,90. OTA foi detectada em 15 amostras (22,1 %) por CLAE (0,84 a 4,70 µg/Kg) e 10 amostras (14,7 %) por ic-ELISA (3,90 a 7,30 µg/Kg), sendo a relação ELISA/CLAE de 1,1 a 1,6. Aliada à baixa contaminação natural, a OTA não foi detectada por ambos os métodos em 77,9 % (53) das amostras, demonstrando qualidade e segurança do café pertencente à safra 2003. Considerando a dificuldade ao acesso de análise avançada de resíduos tóxicos na rotina laboratorial e por outro lado, pela necessidade em minimizar a dependência de importação de *kits* imunoquímicos, foi introduzida a tecnologia de produção de AcM empregando hibridoma linhagem OTA.1. O cultivo celular em meio sintético e cavidade peritoneal de camundongo resultou em 387,23 mg de IgG purificada, mantendo-se 80,82 % da atividade anti-OTA. O AcM foi utilizado na confecção de coluna de imunoafinidade (CIA) baseada em sílica-hidrazida (CIA-Hz), testando-se quatro concentrações de IgG imobilizada (16,43; 19,79; 23,15 e 22,12 mg IgG/g sílica). As CIA-Hz apresentaram retenção de 8,06; 9,62; 11,24 e 10,67 ng de OTA, respectivamente, e atividade específica variando de 0,96 a 0,98. A CIA-Hz selecionada (11,24 ng de OTA/11,57 mg de IgG imobilizada) caracterizou-se por eficiência na limpeza de diferentes matrizes (arroz, milho, café) artificialmente contaminados com OTA, com recuperação média de 62,87 (arroz), 71,33 (milho) e 54,58 % (café verde). CIA-Hz apresentou eficiência entre 78,23 a 81,31 % em relação à CIA OchraTest (produto comercial), demonstrando melhor desempenho da coluna comercial. A reutilização de CIA foi avaliada após procedimento de regeneração da coluna mediante estudo de recuperação de OTA. A utilização sucessiva de CIA-Hz reduziu gradualmente a recuperação de OTA para 29,13 % (arroz), 44,90 % (milho) e 10,23 % (café), após cinco usos consecutivos. CIA OchraTest apresentou recuperação aceitável após 4 regenerações na análise de arroz e milho, com manutenção média de 94,82 % (94,47-95,17 %) e 92,95 % (92,56-93,33 %) da capacidade original da coluna, respectivamente. A eficiência de CIA-Hz em relação à CIA OchraTest foi de 78,23-81,31 % (primeiro uso), 67,41-75,16 % (segundo uso), 48,82-58,40 % (terceiro uso), 40,10-61,09 % (quarto uso) e 39,15-73,33 % (quinto uso), dependendo da matriz. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a CIA-Hz desenvolvida pode ser aplicada na análise de OTA, com restrição ao uso único, devendo-se prosseguir com o estudo inserindo novas condições e ensaios de padronização.

Palavras-chave: Alimentos – qualidade. Alimentos – indústria. Cromatografia líquida de alta eficiência. Ocratoxinas.

FUJII, Simone. **Immunochemical methods for OTA detection, production of immunoreagent and application in different food matrices.** 2007. 119p. Thesis (Doctor in Science of Food) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The monitoring targeted on OTA control in agri-food system should be coupled with accurate analytical method, where the ready reagent production with analytical development proposal, accessible at the national condition, should be stimulated. The production of specific immunoreagent associated with development of immunochemical assay could be possible to laboratories of quality control the access to methodologies to prevention of the contamination and supply of safe food. Indirect competitive ELISA (ic-ELISA) based on anti-OTA.7 monoclonal antibody (mAb) was developed, and its performance compared by high performance liquid chromatography (HPLC). The analysis of 68 coffee samples of the Northern Paraná state (2003 crop) demonstrated reliability and efficiency of ic-ELISA, with HPLC correlation coefficient of 0.90. OTA was detected in 15 samples (22.1%) by HPLC (0.84 to 4.70 µg/Kg) and 10 samples (14.7%) by ic-ELISA (3.90 to 7.30 µg/Kg), with ELISA/HPLC relation from 1.1 to 1.6. In addition to low natural contamination, OTA was not detected by both methods in 77.9 % (53) samples, indicating adequate quality and safety of coffee belonging to 2003 crop. Taking into account the difficulty in accessing advanced analysis of toxic residues in routine laboratory assay, and further request on minimizing the dependence on immunochemical kit importation, the technology of mAb production using hybridoma cell line OTA.1 was introduced. The cell culture in synthetic medium and mouse ascite tumour raised 387.23 mg of purified IgG with 80.82 % of anti-OTA activity. This mAb was used to prepare the immunoaffinity column (IAC) based in hydrazide-silica (IAC-Hz), carrying out four concentrations of immobilized IgG (16.43, 19.79, 23.15 and 22.12 mg IgG/g silica). The IAC-Hz showed OTA retention of 8.06, 9.62, 11.24 and 10.67 ng respectively, and specific activity ranging from 0.96 to 0.98. The selected IAC-Hz (11.24 ng of OTA/11.57 mg of immobilized IgG) was characterized by efficient cleaning-up when different artificially OTA contaminated matrices were tested (rice, corn, coffee), with recovery average of 62.87 (rice), 71.33 (corn) and 54.58 % (green coffee). IAC-Hz showed efficiency from 78.23 to 81.31 % when compared with IAC OchraTest (commercial product), which confirm higher performance of the commercial column. The reusability of IAC was evaluated after regeneration of the column by assessing the recovery of OTA. The successive use of IAC-Hz gradually reduced the OTA recovery to 29.13 % (rice), 44.90 % (corn) and 10.23 % (coffee), after five consecutive uses. The IAC OchraTest kept acceptable recovery after 4 regenerations concerning rice and corn analysis, i.e. average retention capacity of 94.82 % (94.47-95.17 %) and 92.95 % (92.56-93.33 %) when compared with original column capacity, respectively. The efficiency of IAC-Hz in relation to IAC OchraTest was 78.23-81.31 % (first use), 67.41-75.16 % (second use), 48.82-58.40 % (third use), 40.10-61.09 % (fourth use) and 39.15-73.33 % (fifth use), depending on the substrate in concern. Based on data, the developed IAC-Hz can be used in the OTA analysis, but restricted to only use, and further study should be continued inserting new condition and standardization of assay.

Keywords: Food – quality. Food – industry. High performance liquid chromatography. Ochratoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de AcM: imunização de camundongo, fusão celular, obtenção de hibridomas e cultivo em meio sintético de composição definida e na cavidade peritoneal de camundongo	22
Figura 2 – Conjugação de grupo carboxil de hapteno (H) com grupo amino de carreador protéico (N) através de ativação via carbonildiimidazole (C). A reação entre o hapteno (H) e reagente de ativação (C) forma o composto intermediário carbamato acilimidazole (I) que reage com grupo amino de carreador protéico (nucleófilo) (N) para formação de ligação peptídica estável	24
Figura 3 – Esquema de ic-ELISA para detecção de OTA	26
Figura 4 – Procedimento de limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade.....	29
Figura 5 – Imobilização orientada e aleatória de IgG em suporte sólido (gel de agarose).....	32
Figura 6 – Estruturas de ocratoxinas e seus análogos.....	35
Figura 7 – Desenvolvimento e validação intralaboratorial do método ic-ELISA para análise de OTA em café verde e produtos derivados, artificialmente contaminados.....	40
Figura 8 – Extração de OTA para monitoramento de contaminação natural em amostras de café verde do Norte do Paraná.....	41
Figura 9 – Limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade e quantificação de OTA por CLAE	42
Figura 10 – Quantificação de OTA por ic-ELISA.....	43
Figura 11 –Reativação, cultivo, expansão e manutenção de hibridoma linhagem OTA.1, visando produção de IgG anti-OTA.....	44
Figura 12 –Produção de IgG anti-OTA.1 em meio sintético e tumor peritoneal de camundongo	45
Figura 13 –Purificação de IgG anti-OTA.1: definição metodológica e subsequente <i>scale up</i>	46
Figura 14 –Preparo de suporte sólido sílica-Hz e oxidação de IgG anti-OTA.1 para confecção de CIA-Hz baseada em imunossuporte sílica-Hz-IgG anti-OTA.....	47

Figura 15 –Caracterização de CIA-Hz quanto à eficiência de imobilização de IgG, retenção de OTA e atividade específica	48
Figura 16 –Validação intralaboratorial de CIA-Hz-IgG anti-OTA para diferentes matrizes alimentares (arroz, milho, café verde)	49

LISTA DE SIGLAS

Ac – Anticorpo

AcM – Anticorpo Monoclonal

AcP – Anticorpo Policlonal

Ag – Antígeno

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

BSA – Albumina de soro bovino

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CIA – Coluna de Imunoafinidade

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CNBr – Brometo cianogênico

CV – Coeficiente de variação

DMSO – Dimetil-sulfóxido

FB – Fumonisina

FILIA – *Flow Injection Liposome Immunoanalysis*

GC-IR – Cromatografia Gasosa-Espectroscopia Infravermelho

GC-MS – Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa

HAT – Meio *Dulbecco's modified Eagle's*, contendo 100 µM de hipoxantina, 0,4 µM de aminopterina e 16 µM de timidina)

4R-OH-OTA – (4R)-4-hidroxi-ocratoxina A

HPAC – Cromatografia por Afinidade de Alta Resolução

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

HRP – *Horseradish peroxidase*

H-SFM – Meio *Hybridoma-SFM (serum free medium)*

IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná

Ic-ELISA – *Indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay*

IgG – Imunoglobulina G

JECFA – *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants*

KLH – *Keyhole limpet hemocyanin*

LC-MS – Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa

LOD – Limite de detecção

MRL – *Maximum residue limit*

OTα – Ocratoxina α

OTA – Ocratoxina A

OTB – Ocratoxina B

OTC – Ocratoxina C

OVA – Ovalbumina

PBS – Tampão fosfato de sódio

PBST – Tampão fosfato de sódio + Tween 20

PTWI – Limite tolerável provisório de ingestão semanal

SD – Desvio padrão (*Standard deviation*)

SFB – Soro fetal bovino

TMB – 3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS.....	17
3.2 LIMPEZA E CONCENTRAÇÃO DE ANALITO.....	19
3.3 ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS	20
3.3.1 Anticorpos para imunoenaios	21
3.3.2 Produção de anticorpos contra haptenos	24
3.3.3 ELISA para micotoxinas	25
3.3.4 Coluna de imunoafinidade para detecção de micotoxinas	28
3.3.4.1 Colunas de imunoafinidade de alta resolução	30
3.3.4.2 Fase estacionária para coluna e regeneração de CIA	30
3.3.5 Métodos imunológicos alternativos.....	32
3.4 OCRATOXINA.....	34
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAL	38
4.2 MÉTODOS - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
4.2.1 Desenvolvimento e validação intralaboratorial de ic-ELISA para OTA em café e derivados.....	40
4.2.2 Extração de OTA: Estudo de contaminação em café verde	41
4.2.3 Limpeza de amostra por CIA e quantificação por CLAE	42
4.2.4 Quantificação de OTA por ic-ELISA.....	43
4.2.5 Manutenção de Hibridoma linhagem OTA.1 para produção de IgG anti-OTA.....	44
4.2.6 Produção de IgG anti-OTA em meio sintético e camundongo.....	45
4.2.7 Purificação de IgG anti-OTA.1	46
4.2.8 Preparo de imunossuporte sílica-hidrazida-IgG	47

4.2.9 Caracterização de CIA-Hz anti-OTA	48
4.2.10 Validação de CIA-Hz anti-OTA para diferentes matrizes alimentares	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 RELIABLE INDIRECT COMPETITIVE ELISA FOR OCHRATOXIN A SURVEY IN GREEN COFFEE FROM THE NORTH OF PARANÁ STATE, BRAZIL	51
5.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL VISANDO DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO PARA DETECÇÃO DE OTA EM ALIMENTOS	65
5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE COLUNA DE IMUNOAFINIDADE SÍLICA- HIDRAZIDA-IGG PARA DETECÇÃO DE OTA EM ALIMENTOS	81
6 CONCLUSÕES.....	103
7 PUBLICAÇÕES E TRABALHOS CIENTÍFICOS	104
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem na agricultura uma das bases mais potentes de economia, o que garante fornecimento contínuo de insumos baseados em cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e respectivos produtos derivados, oriundos de processamento.

A produtividade da matéria prima e a qualidade do produto final confrontam com a crescente preocupação centrada no aspecto higiênico-sanitário, seja de alimentos perecíveis de origem animal ou vegetal, com ênfase na contaminação microbiana (bacteriana e fúngica) de caráter inevitável e de difícil controle.

A busca por qualidade está relacionada ao controle de fitopatógenos e fungos toxigênicos, visando minimizar a produção de toxinas naturais nas etapas de pré e pós-colheita. O envolvimento de fungos toxigênicos na cadeia alimentar humana é direcionado a espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*, *Claviceps*, *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo os dois últimos os contaminantes freqüentes na pós-colheita, constituindo risco de produção de micotoxinas.

As alternativas de controle incluem agentes químicos, que incrementam o nível de resíduos indesejáveis e induzem resistência anti-microbiana, além de controle biológico e modificação genética de matéria prima visando defesa natural, que exigem alto custo de implantação e estudo a longo prazo. O fato evidencia que o programa de monitoramento de toxinas ainda constitui procedimento prático, capaz de garantir a qualidade e segurança na cadeia produtiva de alimentos.

A conduta requer desenvolvimento de métodos analíticos eficazes, simples e econômicos para a detecção de toxinas em alimentos, onde a ocratoxina A (OTA) constitui um dos representantes tóxicos com repercussão direta na saúde pública e economia do país. Os métodos propostos para proceder à análise de micotoxina incluem os químicos e imunoquímicos. Os métodos químicos consistem em cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia gasosa-espectroscopia infravermelho (GC-IR). A metodologia imunoquímica representada por imunoensaios e cromatografia por imunoafinidade destaca-se por oferecer triagem rápida e resultados quantitativos confiáveis com alto grau de sensibilidade. A limitação de tais métodos consiste na dependência de produção e importação de anticorpo monoclonal (AcM) ou policlonal (AcP) com alta especificidade e sensibilidade para proceder à sua execução.

Considerando que a precisão na reatividade do ensaio imunológico é dependente de anticorpo específico, a produção de imunorreagente anti-micotoxina despertou o interesse na análise de alimentos sob o ponto de vista de minimizar a dependência atual de importação e o custo de aplicação no controle de qualidade. O fornecimento de reagente imunológico específico, associado ao desenvolvimento de ensaio imunológico compatível com aplicação prática, seriam favoráveis para garantir a qualidade e segurança de produtos agrícolas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Minimizar o custo de reagente imunológico, atualmente dependente de importação, produzindo AcM IgG anti-OTA.1 para o desenvolvimento de ensaio imunológico focado em imunossuporte destinado à confecção de CIA para o controle de qualidade de alimentos. Paralelamente, avaliar a aplicabilidade e eficácia de imunoenensaio desenvolvido como ferramenta prática no diagnóstico rápido de OTA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar intralaboratorialmente ic-ELISA com AcM IgG anti-OTA.7 para análise de OTA em café, correlacionando com CLAE;
- Aplicar ic-ELISA desenvolvido no monitoramento de contaminação natural por OTA em amostras de café verde da região Norte do Estado do Paraná;
- Cultivar e manter hibridoma linhagem OTA.1, secretor de AcM IgG específico para OTA;
- Produzir IgG anti-OTA procedendo ao cultivo de hibridoma OTA.1 no meio sintético e cavidade peritoneal de camundongo, seguido de concentração e purificação;
- Desenvolver imunossuporte empregando sílica-hidrazida e IgG anti-OTA.1 oxidada para a confecção de CIA-Hz (sílica-hidrazida-IgG);
- Validar intralaboratorialmente CIA-Hz quanto à eficiência na limpeza e determinação de OTA em matrizes alimentares (arroz, milho e café), comparando com CIA comercial OchraTest.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FUJII S., GARCIA L.B., HIROOKA E.Y. Metodologia analítica imunoquímica 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. (Parte integrante e atualizada da revisão publicada).

3.1 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS

A presença inevitável de fungos em vegetais, aliada ao difícil controle de micotoxinas pertencentes à categoria de toxinas naturais exige medidas efetivas para minimizar a exposição humana e animal, associadas a condições adequadas de produção e processamento de alimentos (CERNY et al., 2002; WHITAKER, 2003).

O desenvolvimento de método analítico com alta sensibilidade, especificidade, rapidez, reprodutibilidade e facilidade de uso, além da exatidão e precisão é essencial para avaliar exposição humana e animal, e a qualidade de matéria prima agrícola (ONO et al., 2000; van der GAAG et al., 2003).

Os métodos desenvolvidos para proceder à análise quantitativa e qualitativa de micotoxinas incluem cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), cromatografia gasosa-espectroscopia infravermelho (GC-IR) (PESTKA et al., 1994; PETZINGER; WEIDENBACH, 2002; GILBERT; ANKALAN, 2002; PETTERSSON; ABERG, 2003; REINSCH et al., 2005). Além de metodologia química, os imunoenaios representados por *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), imunoafinidade, imunohistoquímica, biosensores e separação imunomagnética vêm se apontando pela praticidade acoplada a sensibilidade (SCOTT; TRUCKSESS, 1997; PETTERSSON; ABERG, 2003; van der GAAG et al., 2003; SHIM et al., 2004; LOBEAU et al., 2005; NGUNDI et al., 2005).

A CCD constitui técnica conveniente para detecção de micotoxinas pela facilidade e rapidez na execução, análise de extratos brutos, baixo custo, detecção múltipla de compostos e visualização direta do perfil cromatográfico baseado na cor, fluorescência e aspecto da corrida (fator de retenção do analito - fr) (VALENTA, 1998; VENTURA et al.,

2005). Entretanto, a baixa sensibilidade do método torna-o pouco eficaz perante os níveis máximos recomendados de micotoxinas em alimentos, propostos pela União Europeia (FAO, 2004). A exemplo tem-se OTA com nível máximo tolerável de 0,5 a 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (EUROPEAN COMMISSION, 2005), contrastando com limite de detecção e quantificação de 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ por CCD, respectivamente (PITTET; ROYER, 2002; VENTURA et al., 2005). O fato evidencia a necessidade de CLAE para análise quantitativa, assim como outros métodos com sensibilidade equivalente.

O método oficial descrito em *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC *International*) para análise quantitativa de micotoxinas é CLAE (GILBERT; ANKLAM, 2002; SYDENHAM; SHEPHARD, 1996). Preconizada para a separação quantitativa com alta eficiência de uma extensa variedade de compostos químicos e biológicos, a CLAE permite análise com eficiência e sensibilidade (GUIMARÃES; COLLINS, 1993; SYDENHAM; SHEPHARD, 1996). Salienta-se ainda a preferência pela CLAE, já que a letalidade em nível de pg a μg de substâncias bioativas tóxicas não voláteis requer sistema de detecção de alta sensibilidade. A meta é atingida para compostos fluorescentes, a exemplo de aflatoxinas e ocratoxinas, através do emprego de sistema detector de fluorescência, com limite de quantificação na faixa de $\mu\text{g}/\text{L}$ (SYDENHAM; SHEPHARD, 1996).

Não obstante, a execução de CLAE exige demanda considerável de reagentes de alto grau de pureza, equipamento e manutenção de alto custo, tempo de análise significativo e supervisão por técnicos especializados, restringindo o emprego na rotina laboratorial (SYDENHAM; SHEPHARD, 1996; GILBERT; ANKLAM, 2002). Salienta-se ainda a dificuldade na análise de compostos não fluorescentes como fumonisinas, para os quais deve-se desenvolver processo de derivatização capaz de atingir nível de detecção compatível com a aplicação na rotina laboratorial de controle de qualidade. Mesmo assim, a sensibilidade atingida não se compara a compostos naturalmente fluorescentes, já que se deve questionar se durante a reação ocorreu derivatização total de todos os analitos alvos, ou se o produto derivatizado formado é estável, ou ainda se não houve formação de outros componentes fluorescentes oriundos da matriz alimentar (UENO et al., 1993; SYDENHAM; SHEPHARD, 1996). Aliado a estes fatores, a eficiência de CLAE na determinação de analitos depende de extensiva limpeza da amostra, tornando indispensável o emprego de minicolunas específicas para a remoção de impurezas e concentração de toxinas no extrato bruto (GUIMARÃES; COLLINS, 1993; VALENTA, 1998).

Após detecção, a confirmação química da micotoxina presente na amostra é essencial para evitar resultados falsos. A coincidência do aspecto visível ou da propriedade cromatográfica não garante que o composto isolado do extrato seja quimicamente idêntico ao padrão de referência (VALENTA, 1998). Entre as técnicas disponíveis para a confirmação destacam-se a espectrofotometria de massa de alta resolução e ressonância magnética nuclear (VALENTA, 1998).

3.2 LIMPEZA E CONCENTRAÇÃO DE ANALITO

A etapa de limpeza é requisito indispensável em análises que exigem baixo limite de detecção, constituindo fator fundamental na proteção de coluna cromatográfica utilizada em CLAE (GONZÁLEZ-PEÑAS et al., 2004). Distintas técnicas, sejam clássicas empregando clarificação e partição líquido-líquido, assim como colunas de extração em fase sólida (sílica, octadecilsilil, fenilsilil, florisil e imunoafinidade) emergiram entre técnicas de limpeza e concentração na análise de micotoxinas (POOLE, 2003).

Desenvolvimento de minicolunas eficazes, capazes de atingir nível de separação em apenas uma etapa cromatográfica, tem sido desafio constante na metodologia analítica. Com o intuito, a literatura descreveu minicolunas com materiais de preenchimento compostos de C₁₈, QMA, sílica, florisil e aminopropil (Waters ®); SAX, *Bond Elut* DEA e PSA (Varian ®); colunas HBL Oasis (Waters ®); coluna multifuncional *Mycosep* 225 (Romer Labs ®) (LLORENS et al., 2002; SIBANDA et al., 2002; POOLE, 2003).

A eficiência do processo de limpeza na análise cromatográfica incentivou a associação de diferentes técnicas de limpeza antes de prosseguir com CLAE. A seqüência envolvendo clarificação com sulfato de amônio, partição com clorofórmio, seguido da coluna de extração constituída de carvão-alumina-celite foi usada para análise de tricotecenos em trigo, obtendo-se recuperação de 85 a 91 % (FURLONG; SOARES, 1995).

A combinação seqüencial de diferentes colunas também tem sido utilizada na limpeza de extratos. Entwisle et al. (2001) utilizaram seqüência de colunas de fenilsilil e imunoafinidade para análise de ocratoxina A (OTA) por CLAE em café torrado, obtendo-se recuperação de 65 a 97 %. Sibanda et al. (2002) conduziram análise semelhante envolvendo determinação de OTA em substrato café torrado, empregando colunas de limpeza constituídas de aminopropil (NH₂) e imunoafinidade, obtendo sensibilidade de 1 µg/Kg com recuperação na faixa de 72 a 84 %.

Uma correlação positiva existe entre a eficiência do processo de limpeza e a propriedade química e física do analito a ser separado. A polaridade devido a presença de grupamento químico, aliado à solubilidade em solvente empregado no processo determinam a interação do analito com os radicais ativos da minicoluna. A conseqüente eficiência na recuperação do analito pela etapa de limpeza e a remoção adequada de interferentes inerentes de matéria prima, permitem a quantificação favorável do composto em estudo (MATEO et al., 2001; VALENTA et al., 1998).

Mateo et al. (2001) evidenciaram baixa eficiência de minicolunas Sep-Pak sílica e florisil na recuperação de tricotecenos (nivalenol) em extratos obtidos de cereais. Os autores alegaram que a alta polaridade de tricotecenos favoreceu a interação com grupos ativos da sílica, assim como a baixa solubilidade em solventes empregados na limpeza, sendo estes os fatores determinantes na baixa aplicabilidade das minicolunas testadas.

Não obstante, as minicolunas preparadas com sílica, fenilsilil, alumina, carbono, aminopropil, octadecilsilil, florisil, cianopropil ou celite constituíram a base para introduzir ferramenta biológica na metodologia analítica, iniciada com a implementação da coluna de imunoafinidade.

3.3 ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS

As técnicas analíticas químicas convencionais, baseadas em CCD e CLAE, são oficialmente aceitas e validadas pela AOAC *International* (SYDENHAM; SHEPHARD, 1996). No entanto, a exigência de extrema limpeza dos extratos alimentares para análise, demanda de reagentes de alto grau de pureza destinados à análise cromatográfica, instabilidade de derivatizados fluorescentes e alto custo de instrumentação e manutenção, sob supervisão de técnicos especializados restringem o uso na rotina laboratorial (UENO et al., 1993; CHU et al., 1988; SYDENHAM; SHEPHARD, 1996; GILBERT; ANKLAM, 2002).

Em vista destas dificuldades, o ensaio imunoquímico constitui técnica analítica alternativa promissora na análise de micotoxinas em alimentos, com ênfase ao ensaio imunoenzimático ELISA. As vantagens consistem na alta sensibilidade das reações imunológicas, capaz de detectar concentrações traço de um composto (ng e pg), pouca ou nenhuma necessidade de limpeza e concentração de analito, baixo custo após padronização, facilidade de operação, além do potencial de utilização no campo (GAZZAZ et al., 1992;

HEFLE, 1995; VALENTA, 1998). Os ensaios imunológicos oferecem ampla variabilidade às modalidades técnicas aplicáveis na pesquisa microbiológica, onde juntamente com a detecção e enumeração de microrganismos, a confirmação da presença de toxinas microbianas seria fundamental ao controle de qualidade de produtos alimentícios (VALENTA, 1998).

Conseqüentemente, os imunoenaios constituem técnicas bioanalíticas aplicáveis em diversas áreas da ciência de alimentos, incluindo análise, microbiologia, nutrição, controle de qualidade e de processo. A potencialidade de técnicas imunológicas já é reconhecida, podendo ser empregadas no controle de adulterações, i.e. na detecção de proteínas (ex., albumina, glúten, gliadina e amilases), hormônios, inseticidas, herbicidas, antibióticos, sulfas, histamina, hipoxantina, ácidos nucleicos, glicoalcalóides, vitaminas, adoçantes, quinina, entre outros (CHOI et al., 2004; FRANK et al., 2004; STANCZYK et al., 2003). Recentemente, as técnicas imunológicas constituem ferramenta básica para o controle de importação de grãos geneticamente modificados em países desenvolvidos importadores de matéria-prima agropecuária (JENNINGS et al., 2003).

Embora o custo inicial do desenvolvimento de um ensaio imunológico seja alto, uma vez padronizado a desvantagem é compensada pela praticidade de um microensaio capaz de reduzir o custo por teste. Técnicas imunológicas tornaram-se alternativas atraentes na análise de alimentos, oferecendo testes de triagem rápida e resultados quantitativos confiáveis com alto grau de sensibilidade (HEFLE, 1995; SPILLANE; O'MULLANE, 1998; SIBANDA et al., 2001).

3.3.1 Anticorpos para imunoenaios

Inicialmente, as técnicas imunológicas foram padronizadas empregando anticorpos policlonais, usualmente produzidos em coelhos ou carneiros (THIRUMALA et al., 2000). Entretanto, as limitações na produção de grande quantidade de AcP consistem no fornecimento contínuo de antígeno altamente purificado para as inoculações, manutenção de biotério, variabilidade individual do animal na qualidade do anti-soro, ou no mesmo animal devido ao intervalo de sangria, o que resulta em diversidade na especificidade e afinidade a antígenos (WYATT, 1992). A produção de anticorpo monoclonal superou o problema, obtendo-se reagente uniforme de alta qualidade, passível de ser empregado na rotina laboratorial (LA PINE; HILL, 2001; NAKANO; NAGATA, 2003).

A qualidade do anticorpo (alta afinidade e especificidade, baixa reatividade cruzada) é essencial para o desenvolvimento de imunoenaios sensíveis na micotoxicologia, já que se baseiam na interação específica entre antígeno-anticorpo (HARLOW; LANE, 1988a; HEFLE, 1995; NAKANO; NAGATA, 2003). A obtenção de anticorpos de alta qualidade depende de imunógenos purificados, protocolo de imunização e critério para seleção de monoclonais específicos (NEWSOME, 1986; HEFLE, 1995; BARNA-VETRÓ et al., 1996). Os AcMs caracterizam-se pela uniformidade, alta especificidade e afinidade constante a um único epítipo, sendo homogêneos na estrutura e especificidade, características estas essenciais na identificação de antígenos em matrizes complexas (GAZZAZ et al., 1992; HEFLE, 1995).

A tecnologia de hibridomas permitiu o fornecimento ilimitado de AcM com especificidade definida, obtido pela imunização de camundongo com antígeno específico, seguido de fusão de célula esplênica secretora de anticorpo com célula de mieloma (Figura 1) (HARLOW; LANE, 1988A; LA PINE; HILL, 2001). A produção de IgG procede-se por cultivo de hibridomas em meio sintético de composição definida (ex., RPMI, DME) ou na cavidade peritoneal de camundongo (HARLOW; LANE, 1988b).

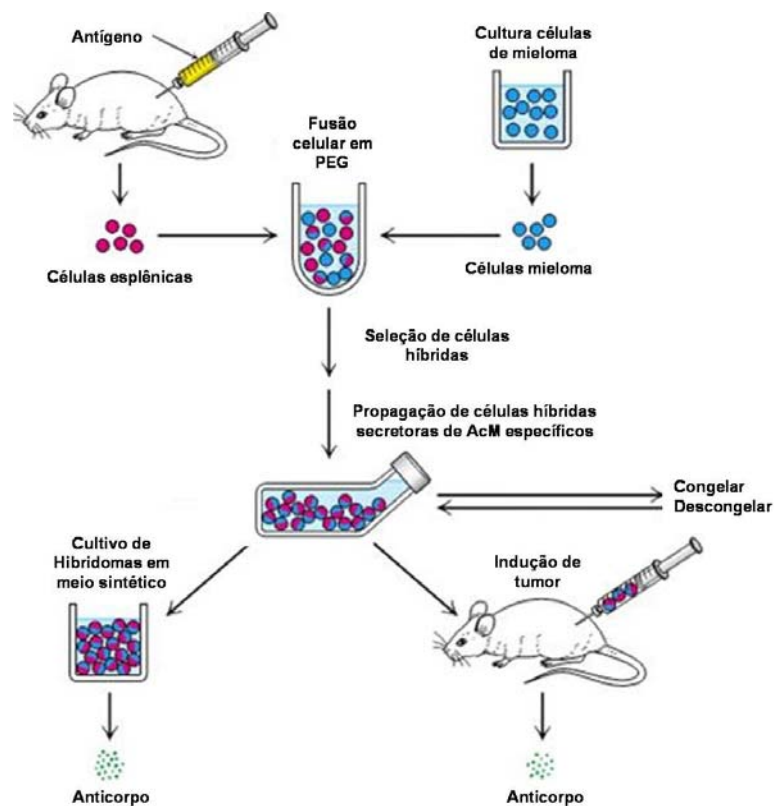


Figura 1 – Produção de AcM: imunização de camundongo, fusão celular, obtenção de hibridomas e cultivo em meio sintético de composição definida e na cavidade peritoneal de camundongo.

Fonte: (BERG et al., 2002)

A obtenção de AcM em tumor peritoneal constitui método prático e acessível à rotina laboratorial, proporcionando alta concentração de anticorpo específico (0,9-9,0 mg/mL). Entretanto, as limitações técnicas baseadas em infra-estrutura para manutenção de animais, considerações éticas para uso experimental, além da presença de hemáceas, fibrina e proteínas inespecíficas no líquido ascítico, capazes de dificultar a purificação, justificam o avanço na prática do cultivo de hibridomas em meio sintético livre de soro fetal bovino (SFB) (ex., *Hybridoma-serum free medium*) (BRUCE et al., 2002).

O cultivo de hibridomas em meio ausente de SFB eliminou problemas relacionados ao uso de soro, i.e. alto custo, heterogeneidade entre lotes e alto teor protéico, que interferem na purificação de AcM (LIDDELL; CRYER, 1991; BRUCE et al., 2002; LEGAZPI et al., 2005). Embora a técnica forneça baixa concentração de IgG (50 µg/mL) (HARLOW; LANE, 1988b), o uso de estimulantes de crescimento (ex., L-glutamina) aliado ao cultivo em sistemas de biorreatores (ex., *CELLine, miniPERM*) têm proporcionado maior produção de anticorpos específicos em relação ao cultivo estático convencional (BRUCE et al., 2002; LEGAZPI et al., 2005; HEILMANN et al., 2005).

Atualmente, a tecnologia de anticorpos recombinantes favorecida pela disponibilidade de bibliotecas de seqüência gênicas para anticorpos, associada ao desenvolvimento de anticorpos exibidos sobre a superfície de fagos filamentosos *Phase Antibody Display*, tem apontado como metodologia alternativa à técnica de imunização em animais (LA PINE; HILL, 2001; MOGHADDAM et al., 2001; MORO; RODRIGUEZ, 2001; ZHANG et al., 2004). A metodologia gera fragmentos de anticorpos a partir do repertório natural de anticorpos, sem necessidade de imunização, aliado a habilidade de manipulação das condições de seleção e estrutura dos componentes produzidos (MOGHADDAM et al., 2001; MORO; RODRIGUEZ, 2001).

A nova tecnologia geraria anticorpos com alta afinidade, caracterizados pela propriedade de ligação ao epítopo, porém instáveis não exercendo ação imune efetora (proteção clínica), mas com perspectivas futuras de aplicação clínica como imunomoduladores e imunoprolifáticos em doenças mediadas por anticorpos (SIEGEL, 2002; LA PINE; HILL, 2001). Conseqüentemente, o uso potencial destes fragmentos de Ac se restringe ao preparo de colunas de imunoafinidade, ou seja, ligação em resinas visando separação cromatográfica dos respectivos antígenos (MOGHADDAM et al., 2001; MORO; RODRIGUEZ, 2001). Anticorpos recombinantes específicos para haptenos, a exemplo de aflatoxina B₁, têm sido selecionados a partir da seqüência gênica de anticorpos e caracterizados quanto à capacidade de ligação a aflatoxinas (MOGHADDAM et al., 2001).

3.3.2 Produção de anticorpos contra haptenos

Micotoxinas mostram-se incapazes de estimular o sistema imune para produzir anticorpos devido à estrutura relativamente pequena (haptenos). Não obstante, as moléculas tornam-se imunogênicas se proceder à conjugação com proteínas carreadoras de alta massa molecular (ex., albumina de soro bovino-BSA). Portanto, deve-se empregar sistema de acoplamento adequado, que garanta manutenção de grupos determinantes de identidade do hapteno (GAZZAZ et al., 1992; HEFLE, 1995; KIM et al., 2003; XIAO et al., 1995a). Conseqüentemente, o preparo de antígeno para imunização (hapteno) requer suporte peptídico pouco imunogênico, visando obter anticorpos monoclonais e policlonais altamente específicos (KIM et al., 2003; MORAN et al., 2002; TUOMOLA et al., 2000). Assim, a imunogenicidade de OTA (403,82 Da) deve-se à conjugação de grupo carboxila ativo na molécula com o grupo amino de carreadores protéico, através do sistema de ativação via carbodiimida, anidrido, carbonildiimidazol ou outros (Figura 2) (HEFLE, 1995; KAWAMURA et al., 1989; XIAO et al., 1995a).

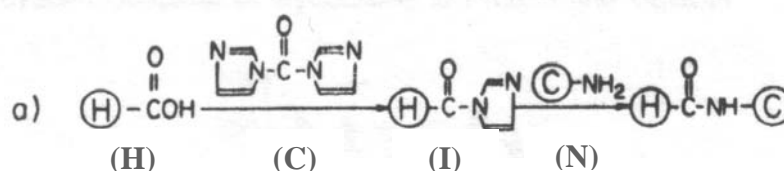


Figura 2 – Conjugação de grupo carboxil de hapteno (H) com grupo amino de carreador protéico (N) através de ativação via carbonildiimidazole (C). A reação entre o hapteno (H) e reagente de ativação (C) forma o composto intermediário carbamato acilimidazole (I) que reage com grupo amino de carreador protéico (nucleófilo) (N) para formação de ligação peptídica estável.

Fonte: (XIAO et al., 1995a)

A seleção de proteína carreadora e método de conjugação para síntese de imunógeno representam etapa crítica na produção de anticorpo específico (DANILOVA, 1994; MORAN et al., 2002; TUOMOLA et al., 2000). Entre os carreadores e adjuvantes destacam-se albumina de soro bovino (BSA), *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) e ovalbumina (OVA). A partir destes reagentes, a tecnologia permite síntese dos conjugados de ocratoxina A (OTA-BSA, OTA-OVA, OTA-KLH), ou fumonisina (FB₁-KLH, FB₁-OVA), destinados à imunização de

animais para obtenção de linfócitos sensibilizados, sendo a qualidade de anticorpos produzidos dependente do suporte protéico (HO; DURST, 2000; KAWAMURA et al., 1989; KIM et al., 2003).

KAWAMURA et al. (1989) prepararam 7 anticorpos monoclonais para OTA, designados de AcM OTA.1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 utilizando BSA como proteína carreadora. Procedendo ao ELISA competitivo indireto (ic-ELISA), os AcMs OTA.1, 3, 4, 5 e 7 apresentaram reatividade cruzada com OTA (100 %) e OTC (63,1-99,5 %), enquanto que reagiram fracamente com os análogos pertencentes a OTB (0,63-1,14 %), OT α (0,04-0,07 %) e 4-hidroxi-OTA (1,19-1,51 %), demonstrando a especificidade imunológica do reagente produzido.

Os resultados sugeriram que o resíduo L-fenilalanina, cloreto e hidrogênio nas respectivas posições C₁₂(R₁), C₅(R₂) e C₄(R₃) na molécula de OTA, conforme apresentado na Figura 6, exerceram grande influência na interação OTA-anticorpo. O AcM OTA.2 reagiu igualmente com OTA e OTB, indicando que a presença de cloreto na posição 5 (R₂) não atuou como epítopo para o anticorpo. O limite de detecção para OTA por ic-ELISA utilizando AcM OTA.1 e OTA.7 foi de 50 pg/mL, evidenciando a alta sensibilidade dos anticorpos (KAWAMURA et al., 1989).

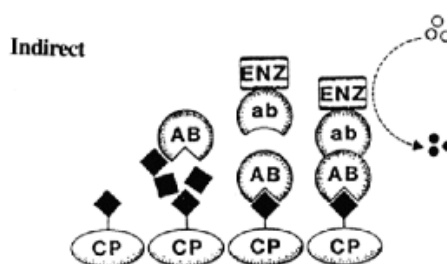
As técnicas imunológicas visando produção de anticorpos específicos vêm sendo sofisticadas, empregando carreadores cada vez menos imunogênicos. Candlish et al. (1988) produziram anticorpos monoclonais em camundongos imunizados com conjugado OTA-KLH. Analisando por ic-ELISA, os autores obtiveram reatividade cruzada de 8,2 % com OTC e limite de detecção de 5 μ g OTA/Kg, assim como ausência significativa de reação com outros análogos, micotoxinas e interferentes, indicando alta especificidade deste anticorpo à OTA.

3.3.3 ELISA para micotoxinas

Tendo em vista que a baixa complexidade e massa molecular de micotoxinas conferem baixa imunogenicidade, a modalidade de ELISA indicada para proceder à determinação de OTA é o competitivo indireto (ic-ELISA), já que esta requer apenas um anticorpo específico (CHU, 1984; HEFLE, 1995). A alta especificidade é fundamental para

evitar reações falso-positivas, sendo a reatividade do ic-ELISA dependente exclusivamente de anticorpo primário (CHU, 1984; HEFLE, 1995).

O princípio de ic-ELISA baseia-se na competição entre a toxina presente na amostra e àquela imobilizada na microplaca (OTA-BSA), pelo sítio de ligação específico do anticorpo monoclonal (NEWSOME, 1986). Nesta modalidade de ELISA, a adsorção do anticorpo à superfície sensibilizada ocorre em proporção inversa à quantidade de analito presente. Isto é, a concentração de toxina na amostra é quantificada indiretamente pela reação oriunda de anticorpo específico anti-micotoxina adsorvido, que atua como sítio de ligação ao anti-IgG (anticorpo secundário) marcado com enzima, responsável pela reação colorimétrica (NEWSOME, 1986; HARADA et al., 1988; HEFLE, 1995). A Figura 3 mostra o esquema de ic-ELISA para análise de OTA.



◆: analito (OTA); CP: proteína carreadora complexada ao analito; AB: anticorpo específico anti-micotoxina (OTA); ab: anticorpo anti-IgG conjugado à enzima.

Figura 3 – Esquema de ic-ELISA para detecção de OTA.

Fonte: (PESTKA et al., 1995)

Em contraste ao preparo de antígeno para imunização (imunógeno), o acoplamento de OTA à microplaca se procede com peptídeo aderente, visando obtenção de conjugado estável (OTA-proteína) e economicamente viável (NEWSOME, 1986; KAWAMURA et al., 1989; DANILOVA, 1994; KIM et al., 2003). Conjugados de OTA-BSA, KLH e OVA apresentaram razão molar de 16,7; 19,1 e 0,3-0,5, respectivamente (KAWAMURA et al., 1989). Embora KLH constitua uma melhor carreadora de OTA, depara-se com alto custo. A OTA-OVA apresenta menor estabilidade em relação ao mesmo reagente preparado com BSA, além da perda de atividade devido ao congelamento. Embora as referências anteriores justificassem a utilização de BSA pela maior estabilidade, menor custo e eficiência na conjugação com OTA (KAWAMURA et al., 1989), os trabalhos recentes vêm

modernizando as técnicas de haptização inserindo novas moléculas (lipossomos) para incorporação de haptenos (HO; DURST, 2000; HO; DURST, 2003).

A desvantagem de análise por ELISA limita-se a determinados tipos de alimentos, em vista ao efeito de matrizes que resultam em interferência nas reações imunológicas. Isto é, interações inespecíficas de anticorpo a componentes alimentares (proteínas, ácidos graxo), ou bloqueio estérico da ligação entre anticorpo e analito superestimariam a concentração da micotoxina, resultando em reação falso-positiva (HEFLE, 1995; BARNA-VETRÓ et al., 1996). Conseqüentemente, a vantagem na eliminação da extensiva etapa de pré-limpeza ostentada pelo ELISA resulta na permanência de constituintes alimentares inconvenientes, capazes de reagir com os anticorpos. O fato acentua a resposta inibitória no imunoensaio por competição, afetando o sítio de ligação do anticorpo. Esta inespecificidade pode ser minimizada diluindo o extrato bruto, ou adotando processo simples de limpeza (BARNA-VETRÓ et al., 1996; PESTKA et al., 1994).

Para obter resultados mais consistentes no ic-ELISA é aconselhável que a especificidade seja obtida empregando anticorpo monoclonal (um sítio específico), capaz de aumentar a reprodutibilidade, facilitando a padronização do ensaio e estabilidade do reagente (ONO et al., 2000; HEFLE, 1995). Todavia, deve-se minimizar a reatividade cruzada com os mais variados componentes alimentares, problema de difícil solução, devido ao lançamento contínuo de novos produtos processados, visando aumento da competitividade para atender o mercado cada vez mais exigente e globalizado.

O procedimento adotado para contornar o problema consiste na análise comparativa através de correlação com CLAE dos imunoensaios desenvolvidos, o que permite estabelecer a relação entre as metodologias e a confiabilidade do ensaio imunoquímico. Estudos comparativos de ic-ELISA com CLAE vêm sendo desenvolvidos visando à implementação de imunoensaio como ferramenta prática no diagnóstico rápido de micotoxinas para o controle de qualidade em alimentos. Os resultados obtidos demonstraram a aplicabilidade de ic-ELISA como método alternativo em relação ao método confirmatório CLAE (FUJII et al., 2006b).

Apesar de críticas e limitações, o ensaio imunoquímico vem gradativamente ocupando o espaço na micotoxicologia (HEFLE, 1995). Aliada às vantagens mencionadas, a simplicidade e rapidez de análise, reprodutibilidade, necessidade de pequeno volume de amostra, baixo custo após a padronização do ensaio e potencial de triagem em campo, comparado aos métodos analíticos convencionais, emergem como características destacáveis do ensaio imunoenzimático (HEFLE, 1995; BARNA-VETRÓ et al., 1996).

3.3.4 Coluna de imunoafinidade para detecção de micotoxinas

A técnica cromatográfica por imunoafinidade pode ser considerada como uma inovação na área de metodologia analítica para detecção de toxinas de origem biológica de baixa massa molecular, anteriormente centrada em procedimentos químicos. A modalidade introduziu componente biológico (anticorpo imobilizado em minicoluna) na etapa de limpeza, seguida de análise qualitativa-quantitativa empregando CLAE, ou outras metodologias analíticas de alta sensibilidade (JURADO; JARRET, 2003; KONDO et al., 2002).

A incorporação de procedimento biológico (coluna de imunoafinidade) à metodologia química analítica consistiu em alternativa promissora às técnicas convencionais de limpeza na análise de micotoxinas, conferindo rapidez e especificidade na etapa do preparo de amostra (WATANABE et al., 2001; ZHAO et al., 2003).

As CIA preparadas com anticorpos anti-micotoxinas destacam-se por proporcionar simplicidade, alta especificidade e recuperação, melhorando limites de detecção e possibilitando análise de variedade de compostos em distintas matrizes complexas. Uma vantagem incontestável está na utilização de solução tampão, dispensando o emprego de grandes volumes de solventes tóxicos durante o preparo de analito, além de automatização técnica e disponibilidade comercial (SCOTT; TRUCKSESS, 1997).

As colunas compõem-se de um suporte de fase sólida ativada, a exemplo de *Sepharose*®-CNBr, onde se imobilizam os anticorpos específicos contra determinada micotoxina (SCOTT; TRUCKSESS, 1997; JURADO; JARRET, 2003). O processo de limpeza baseia-se na retenção seletiva de micotoxinas presentes no extrato a anticorpos imobilizados da coluna, seguido de eluição com solvente apropriado (Figura 4). A imobilização de anticorpos à matriz da coluna e a afinidade do analito específico durante a limpeza da amostra, lavagem e condições de eluição são fatores determinantes da eficiência e aplicabilidade da CIA (WIMALASENA; WILSON, 1991; SHELVER et al., 2002).

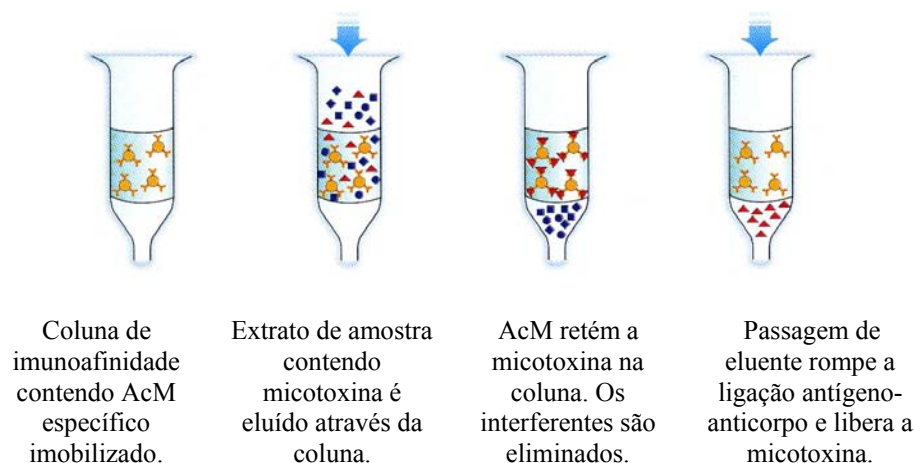


Figura 4 – Procedimento de limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade.

Fonte: (R-BIOPHARM RHÔNE Ltd., USA)

Distintas técnicas de limpeza em fase sólida (C_{18} , sílica, florissil, SAX e CIA) foram avaliadas quanto à determinação de OTA e outras micotoxinas em produtos alimentícios (de GIROLAMO et al., 2001; DRAGACCI et al., 2001; LLORENS et al., 2002). Os resultados apontaram a eficiência da CIA na remoção de interferentes nos extratos alimentares, melhorando o limite de detecção por CLAE.

Para a análise de OTA, encontram-se disponíveis colunas de imunoafinidade comerciais OchraTest (Vicam®); OchraPrep e Ochrascan *Easi-Extract ochratoxin* (Rhône Diagnostics®); Rida *ochratoxin A column* (R-Biopharm®) (CASTELLARI et al., 2000; SCOTT; TRUCKSESS, 1997).

A cromatografia por afinidade tem sido amplamente difundida na análise de OTA em matrizes complexas, como café (SIBANDA et al., 2002), vinho (DALL'ASTA et al., 2004), cerveja (VICONTE et al., 2000); aflatoxina em ração (SHARMA; MÁRQUEZ, 2001), produtos lácteos (DRAGACCI et al., 2001), alimentos infantis (STROKA et al., 2001), amendoim e páprica (STROKA et al., 2000); fumonisinas em milho e produtos derivados (CHENG et al., 2002); tricotecenos em pipoca, milho (OLIVEIRA et al., 2001), trigo, cevada e malte (TACKE; CASPER, 1996), arroz, aveia e sorgo (PASCALE et al., 2003); zearalenona em cereais e rações (FAZEKAS; TAR, 2001) e microcistina em água (KONDO et al., 2002; AGUETE et al., 2003).

3.3.4.1 Colunas de imunoafinidade de alta resolução

Recentemente, a incorporação *on line* de coluna de imunoafinidade de alta resolução a coluna de CLAE resultou em método caracterizado por rapidez e simplicidade no preparo de amostra, redução de solventes orgânicos, além de alta eficiência na separação. A técnica, denominada de cromatografia por afinidade de alta resolução (HPAC), combina a especificidade inerente de cromatografia por afinidade à eficiência e sensibilidade da CLAE para separação de distintos compostos (HOLTZAPPLE et al., 2001; JURADO; JARRET, 2003).

HOLTZAPPLE et al. (2001) reportaram a relevância da associação biológica-química na análise de fluoroquinilonas em soro, onde evidenciaram a redução no tempo de preparo e análise de amostras, com vantagem da reutilização e estabilidade da coluna HPAC, i.e. obtenção de resultados confiáveis após múltiplas análises.

A disponibilidade comercial de CIA, para análise de micotoxinas em diferentes matrizes visando controle de qualidade em alimentos, é universal. Não obstante, o fator limitante nos países em desenvolvimento tem sido o alto custo dos *kits* produzidos pelas empresas multinacionais. A auto-suficiência da produção de reagentes para suprir parte da demanda nestes países agrícolas torna-se fundamental para garantir a competitividade de insumos básicos no mundo globalizado. Outrossim, o interesse despertado tem estimulado a possibilidade de preparo de colunas a partir da produção de anticorpos monoclonais e policlonais específicos, bem como o uso de suportes sólidos adequados (CASTELLARI et al., 2000; ENTWISLE et al., 2001; NAKANO; NAGATA, 2003).

3.3.4.2 Fase estacionária para coluna e regeneração de CIA

Suportes sólidos constituídos de polissacarídeos (ex., *Sepharose*, celulose, agarose) são freqüentemente empregados para proceder à cromatografia por afinidade, devido a simplicidade de ativação e acoplamento de ligantes, mas a instabilidade mecânica limita o uso em cromatografia por afinidade de alta resolução. Suportes de sílica empregados em CLAE surgiram como alternativa para HPAC, caracterizando-se pela alta eficiência e estabilidade mecânica em relação ao gel de *Sepharose*, além de permitir modificação

superficial por adição de grupo funcional. O fato minimiza a adsorção inespecífica e favorece a acessibilidade a ligantes específicos (ex., IgG) (RHEMREV-BOOM et al., 2001; TONHI et al., 2002; JURADO et al., 2002; JURADO; JARRET, 2003).

Novas estratégias têm sido descritas para o desenvolvimento de suportes de fase sólida destinados à cromatografia de imunoafinidade, com ênfase ao procedimento de ativação de matriz e acoplamento de ligantes específicos (anticorpo), visando obter imunossuporte com alta atividade específica, estabilidade e seletividade (WIMALASENA; WILSON, 1991; RHEMREV-BOOM et al., 2001; SHELVER et al., 2002). Destaca-se o método desenvolvido por Jurado e Jarret (2003), consistindo em ativação e acoplamento dinâmico da coluna de sílica-diol através de fluxo de soluções contendo brometo cianogênico (CNBr) e trietilamina, em sistema de CLAE. A técnica foi caracterizada pela redução de custo e tempo de preparo, aliada a eficiência no acoplamento e menor toxicidade durante o processo de ativação da matriz.

A orientação da imobilização de biomolécula (ex., IgG) à matriz sólida constitui fator decisivo na reatividade do imunossuporte, e é dependente do método de ativação da matriz e grupo reativo disponível no anticorpo para o acoplamento (PFEIFFER et al., 1987; WIMALASENA; WILSON, 1991). O acoplamento aleatório de IgG via grupo amino, carboxil ou sulfidril livre ocasiona orientação inadequada, desnaturação, ou fixação de Ac em pontos múltiplos na matriz, resultando em baixa eficiência de CIA. A imobilização direcionada de IgG (via molécula de carboidrato ou grupo tiol) superou o problema, favorecendo a acessibilidade estérica do sítio Fab ao antígeno (Figura 5) (WIMALASENA; WILSON, 1991; RUHN et al., 1994; RHEMREV-BOOM et al., 2001; GERING et al., 2002).

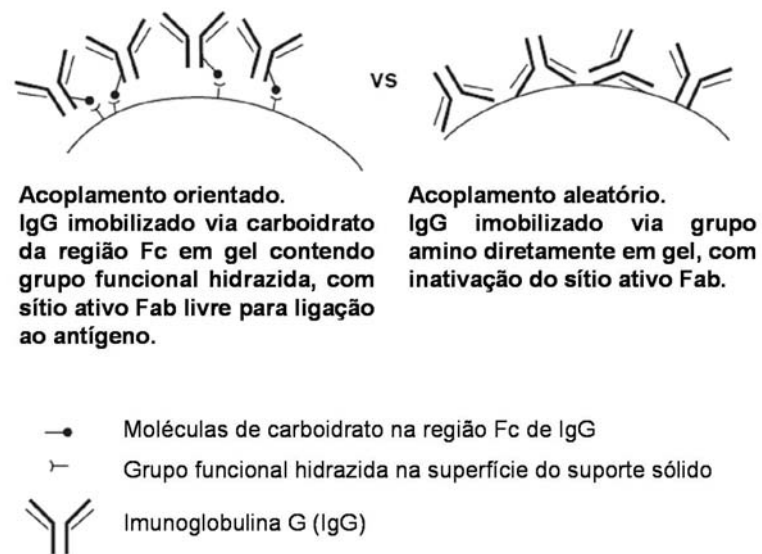


Figura 5 – Imobilização orientada e aleatória de IgG em suporte sólido (gel de agarose).

Fonte: (BIO-RAD LABORATORIES, USA)

As desvantagens referentes ao alto custo de coluna comercial e alto teor de IgG requerido para a confecção de CIA tendem a ser minimizadas aplicando processo de regeneração da coluna, capaz de permitir reutilização sem perda significativa na atividade (SCOTT; TRUCKSESS, 1997; FAZEKAS; TAR, 2001; WATANABE et al., 2001; KONDO et al., 2002).

KONDO et al. (2002) desenvolveram CIA reutilizável para a purificação de microcistinas em água de lagoa, acoplando anticorpos monoclonais anti-microcistina em suporte *Formyl-Cellulofine*® ativado. A eficiência da coluna na recuperação da toxina foi mantida por três usos consecutivos, após simples processo de regeneração em tampão Tris-HCl com BSA, sendo de 87-88 % para 1º uso, 83-88 % para 2º e 3º usos, seguido de 63-77 % referente ao 4º e 5º usos. A reutilização da CIA repercute em diminuição de custo e quantidade de anticorpos requeridos para a análise de amostras.

3.3.5 Métodos imunoquímicos alternativos

O preparo de imunorreagente destina-se também ao desenvolvimento de ensaios imunoquímicos alternativos ao ELISA (HO; DURST, 2000; HO; DURST, 2003;

MELUCCI et al., 2003). A exemplo cita-se a produção de anticorpos policlonais contra fumonisina B₁ em carneiro imunizado com conjugado FB₁-KLH, direcionada à padronização da técnica de *flow injection liposome immunoanalysis* (FILIA), para detecção de FB₁ em alimento (HO; DURST, 2000; HO; DURST, 2003).

Considerando que imunoenaios baseados em ELISA constituam técnicas qualificadas de alta especificidade e sensibilidade, métodos imunquímicos similares ao microensaio têm sido reportados, com a vantagem em disponibilizar menor tempo de análise e maior praticidade (SPILLANE; O'MULLANE, 1998; SIBANDA et al., 2001; de SAEGER et al., 2002). Spillane e O'Mullane (1998) desenvolveram ELISA em coluna de afinidade constituída de *Sepharose* e anticorpos anti-ferritina imobilizados para análise de ferritina. A técnica apresentou simplicidade, rapidez e confiabilidade destacáveis, permitindo a reutilização da coluna de ELISA após tratamento adequado sem perda significativa na atividade, com sensibilidade de 0,7 µg/L e recuperação de 101,9 %. Lobeau et al. (2005) desenvolveram imunensaio enzimático em coluna para análise semi-quantitativa de OTA em café torrado. A coluna compreendeu uma camada de sílica-aminopropil, capaz de adsorver os interferentes oriundos da matriz alimentar, seguida de imunossuporte contendo anticorpo anti-OTA, para prosseguir com ensaio colorimétrico na mesma coluna. O ensaio proporcionou triagem rápida, simples e de custo acessível, apresentando *cut-off* de 6 µg/Kg com sensibilidade e especificidade de 92 e 100 %, respectivamente.

Ensaio imunoenzimático (ELISA) baseado em membrana imobilizada com anticorpos anti-micotoxinas, *flow through enzyme immunoassay*, aponta entre métodos de diagnóstico rápido, com eficiência comparável a CLAE na análise de micotoxinas em cereais (de SAEGER et al., 2002; SIBANDA et al., 2001). A triagem de OTA em grãos de café por este ensaio foi avaliada por Sibanda et al. (2001), empregando membranas com anticorpos policlonais anti-OTA e conjugado OTA-HRP, atingindo sensibilidade de 8 µg/Kg.

A utilização de lipossomos no desenvolvimento de imunoenaios tem despertado interesse entre os métodos analíticos rápidos, com custo acessível à análise de micotoxinas. A técnica designada FILIA acopla antígenos ou haptenos na membrana do lipossomo contendo composto fluorescente encapsulado e, baseia-se na competição entre antígeno da amostra e Ag de referência adsorvido ao lipossomo, pela ligação específica ao anticorpo (HO; DURST, 2000; HO; DURST, 2003). Estudo comparativo de FILIA com CLAE na detecção de fumonisina B₁ (FB₁) em alimentos foi desenvolvido por Ho e Durst (2003), que avaliaram a reprodutibilidade e eficácia do ensaio baseado em lipossomos,

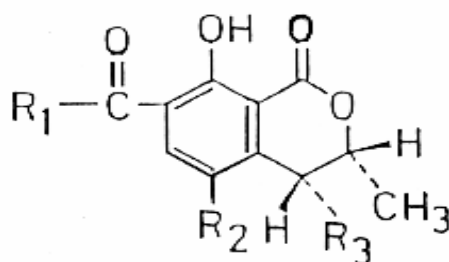
atingindo recuperação de 80 a 92 % e sensibilidade de 0,1 ng de FB₁. A pesquisa apontou correlação favorável entre as metodologias ($r = 0,945$), caracterizando FILIA por desempenho comparável a CLAE, associado a menor complexidade na etapa de preparo de amostra.

3.4 OCRATOXINA

As ocratoxinas constituem metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., capazes de contaminar uma ampla variedade de produtos agrícolas. *A. ochraceus* e *P. verrucosum* constituem as principais espécies toxigênicas (PETZINGER; WEIDENBACH, 2002; ACCENSI et al., 2004; LIN et al., 2005; BAU et al., 2005). Outrossim, novas espécies principalmente pertencentes ao gênero *Aspergillus* vêm sendo investigadas e relatadas, em vista da inserção de biologia molecular na caracterização taxonômica de grupos toxigênicos (SWEENEY; DOBSON, 1999; MOUYNA et al., 2002).

Entre as ocratoxinas e análogos que compõem o grupo, a literatura relata ocorrência de ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina C, ocratoxina α , ocratoxina β , metiléster de OT α , 4-hidroxi-OTA entre outros (XIAO et al., 1995b; HARRIS; MANTLE, 2001; KAWAMURA et al., 1989). A Figura 6 apresenta os principais representantes do grupo. OTA destaca-se pela maior toxicidade e ocorrência natural em produtos vegetais, envolvendo-se em intoxicações clínicas e subclínicas em animais e na etiologia de doenças humanas (IARC, 1993; FINK-GREMMELS et al., 1995; PETZINGER; WEIDENBACH, 2002; GROSSO et al., 2003).

Quimicamente, a OTA (7-[L- β -fenilalanil carbonil]carboxil-5-cloro-8 hidroxil-3,4 diidro-3R metil isocumarina) constitui uma molécula de massa molecular 403,82 dalton (Da) com polaridade média e alta estabilidade térmica, caracterizada pela presença de grupos cromóforos com propriedades fluorescentes sob luz UV a 335nm (VALENTA et al., 1998) Por outro lado, o caráter isocumarina da molécula e o grupo carbonil lactona conferem a atividade tóxica (XIAO et al., 1996).



Ocratoxina	R ₁	R ₂	R ₃
Ocratoxina A	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(COOH)NH-	Cl-	H-
Ocratoxina B	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(COOH)NH-	H-	H-
Ocratoxina C	C ₆ H ₅ CH ₂ CHCOO(C ₂ H ₅)NH-	Cl-	H-
Metilester ocratoxina α	CH ₃ O-	Cl-	H-
4-hidroxi-ocratoxina A	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(COOH)NH-	Cl-	OH-
Ocratoxina α	OH-	Cl-	H-

Figura 6 – Estruturas de ocratoxinas e seus análogos.

Fonte: (KAWAMURA et al., 1989)

O estudo sobre estrutura química de OTA constitui etapa essencial à produção de reagente imunológico para direcionar a síntese de anticorpo específico. Isto é, sendo molécula de baixa massa molecular, incapaz de induzir a produção de anticorpo, a conjugação desta toxina com proteína carreadora torna-se essencial para expor os grupos ativos da molécula de micotoxina (XIAO et al., 1995a).

A evidência de propriedades toxicológicas da OTA em diversas espécies animais se deve a efeitos nefrotóxico, teratogênico, citotóxico, imunotóxico, genotóxico, imunossupressor e possivelmente carcinogênico (IARC, 1993; FINK-GREMMELS et al., 1995; HUSSEIN; BRASEL, 2001; KAMP et al., 2005). Os mecanismos envolvidos decorrem da redução na síntese protéica, ocorrendo inibição competitiva na atividade de fenilalanina-RNA-sintetase, inibição de respiração mitocondrial com depleção de síntese de ATP e aumento na peroxidação lipídica (XIAO et al., 1995b). Aliado aos efeitos primários, o processo de biotransformação hepática da OTA, com formação de intermediários reativos instáveis, emerge como elemento contribuinte na genotoxicidade e mutagenicidade (FINK-GREMMELS et al., 1995; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Baseado na toxicologia de OTA e presença em produtos alimentícios, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants* (JECFA) estabeleceu um limite tolerável provisório de ingestão semanal (PTWI) em 100 ng/Kg de peso corpóreo, visando assegurar ausência de efeitos nefrotóxicos (BERG, 2003). Limites máximos para OTA são regulamentados em diversos países, cujos valores variam de 5 µg/Kg para cereais

crús, 3 µg/Kg para derivados de cereais, 10 µg/Kg para frutas secas, 5 a 20 µg/Kg para café verde, 5 µg/Kg para café torrado, 10 µg/Kg para café instantâneo, 2 µg/Kg para vinho/suco de uva e 0,5 µg/Kg para alimento infantil/dietético (EUROPEAN COMMISSION, 2005; FAO, 2006). No Brasil, ainda não existe legislação específica definindo OTA em qualquer tipo de alimento ou ração (BERG, 2003).

A exposição humana decorre da ingestão de uma variedade de alimentos, sendo os cereais e derivados as fontes representativas de OTA na dieta (40-50 % de ingestão total). Entre os contribuintes secundários destacam-se os produtos cárneos, especiarias, cerveja, cacau, frutas secas, vinho, chás, sucos de frutas e café (CHOLMAKOV BODECHTEL et al., 2000; TANIWAKI et al., 2003; SAEZ et al., 2004; BERENTE et al., 2005; FAO, 2006; MATRELLA et al., 2006).

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora as perspectivas futuras indiquem que os ensaios imunoquímicos representem alternativa atrativa para a análise de alimentos, o risco de reações falso positivas ainda dificulta o enquadramento entre os métodos oficiais reconhecidos pela AOAC. A confiabilidade da análise de micotoxinas (OTA) conduzidas pelo ELISA, assim como a sua eficiência no contexto de metodologia analítica alternativa devem ser correlacionadas com a CLAE, que constitui referência imposta pela AOAC *International*.

Entretanto, a atual introdução de métodos baseados em princípios imunoquímicos é incontestável. O impacto causado na metodologia analítica se justifica por ser técnica qualificada de alta sensibilidade, indispensável na detecção de toxinas na segurança de alimentos visando diagnóstico rápido, bem como se desponta interesse na produção de anticorpos específicos para a condução da análise.

A cromatografia de afinidade é uma inovação na área, que confere especificidade e eficiência ao processo de limpeza, e concentração na etapa de extração de analito. Com o intuito, a coluna de imunoafinidade vem sendo amplamente difundida na análise quantitativa de micotoxinas, em associação a CLAE, espectrofluorimetria ou ELISA. O procedimento sequencial entre métodos (biológico-químico) solucionaria as desvantagens descritas sobre cada processo. Isto é, a coluna de imunoafinidade garantiria a limpeza

eficiente dos extratos, enquanto que a CLAE asseguraria a resposta confirmativa da análise. Sendo assim, o emprego de anticorpos policlonais e monoclonais constitui a base promissora, introduzindo procedimento biológico na metodologia analítica e mostrando a imprescindível necessidade de integração das diferentes áreas de ciência básica e aplicada, para atingir o objetivo final da qualidade e segurança em alimentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

AcM anti-OTA.7 (79,4 % de reatividade cruzada com OTC) foi previamente preparado por KAWAMURA *et al.* (1989). OTA, OVA, anticorpo anti-IgG-HRP, Pristane (2,6,10,14 ácido tetrametil-decanóico), 3-glicidoxi-propil-trimetoxi silano, dihidrazida adipica (25 mmol) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); TMB (Dojindo, Japan); 30 % peróxido de hidrogênio (Merck KgaA, Darmstadt, Germany); DMSO (Trade TCI, Japan); microplacas de 24 e 96 orifícios, criotubos (Corning, USA); filtro de microfibra de vidro (GF/C 2,5 cm i.d) (Whatman International Ltd., Maistone, England); CIA OchraTest (Vicom Inc., Watertown, USA); acetonitrila e ácido acético, grau HPLC (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA); meio RPMI 1640, soro fetal bovino, Hybridoma-SFM (serum free medium), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, sulfato de amônio (Gibco Co., USA); frascos para cultivo de células de 25, 75 e 150 cm² (Nunc, Denmark); corante vital Azul de Trypan, m-periodato de sódio 0,1 M, etilenoglicol, ácido periódico (Acros Organics, New Jersey, USA); coluna de *Sepharose* Proteína G (Amersham Biosciences, Sweden); sílica *Polygoprep* 300-50 (Machery-Nagel, USA); NaBH₄ (Wako Pure Chemical Co., Tokyo, Japan). Freezer (-20 ° C) (CFC FREE, Sanyo, USA); recipiente de nitrogênio líquido (-185° C) (Cryo Diffusion, France); incubadora sob 5 % CO₂ (Forma Scientific, USA); BOD (TE-391, Tecnal, Brasil); espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20 (GMB, Brasil); leitora de ELISA (Bio-Tek *Instruments* ELX800, USA); sistema *Stirred Cell* 8400, membranas de exclusão molecular de 100 Kda (YM 100, celulose) (Millipore Co., Bedford, MA, USA); banho ultrasônico (*Ultrasonic cleaner* Unique); água ultra-pura (*Ultra Pure Water System Milli-Q plus*, Millipore Corp., Bedford, MA, USA); bomba LC-10AT VP, detector de fluorescência RF-10AXL, Shimadzu, Japan); coluna Nucleosil 100 C₁₈ (5 µm, 4 x 250 mm, Merck, Germany).

A célula de hibridoma consistiu de linhagem OTA.1 secretora de AcM (isotipo IgG₁ kappa) específico para OTA e reativo com OTC (63,1 %). O hibridoma foi derivado de mieloma linhagem Sp2/0-Ag14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, produzido por Kawamura *et al.* (1989) em *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science*

University of Tokyo e mantido em *Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão*.

4.2 MÉTODOS - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia executada no transcurso da pesquisa foi esquematizada sob forma de fluxograma no tópico Delineamento Experimental, conforme abaixo apresentado. O procedimento técnico, redigido em detalhes, foi inserido em cada capítulo descrito no item Resultados e Discussão, visando posterior publicação.

Tendo como meta principal o fornecimento de imunorreagente para o controle de qualidade de produtos alimentícios, o delineamento experimental foi baseado no fluxograma iniciado no ano de 2001 com a dissertação de Mestrado. A confiança dos pesquisadores japoneses na concessão de hibridomas foi adquirida ao longo de intercâmbio iniciado pelo líder do Grupo Toxinas Microbianas, a partir de 1989. A primeira etapa foi iniciada com o fornecimento de AcM IgG anti-OTA.7, através do qual houve a possibilidade de validação intralaboratorial de ic-ELISA centrada em OTA, seguido de monitoramento de contaminação natural por OTA em café da Região Norte do Paraná (n = 68). Posteriormente, o trabalho em conjunto evoluiu para o fornecimento de hibridoma linhagem OTA.1 pelo Prof. Dr. Osamu Kawamura de *Kagawa University, Japão*. Abaixo, consta a seqüência sucinta sobre a evolução da pesquisa desenvolvida.

4.2.1 Desenvolvimento e Validação Intralaboratorial de ic-ELISA para OTA em Café e Derivados

O desempenho de ic-ELISA na detecção de OTA foi previamente avaliado mediante café verde e produtos derivados artificialmente contaminados, utilizando AcM anti-OTA.7 (Figura 7).

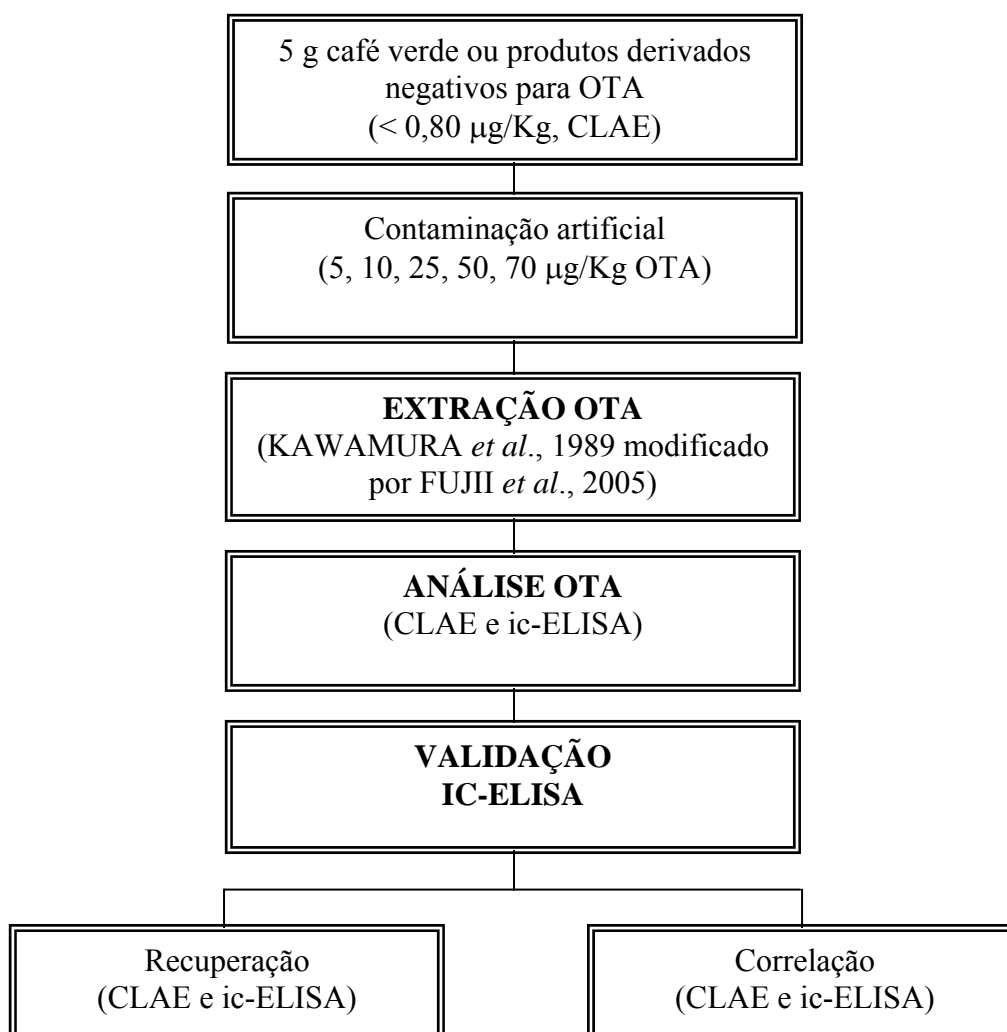


Figura 7 – Desenvolvimento e validação intralaboratorial do método ic-ELISA para análise de OTA em café verde e produtos derivados, artificialmente contaminados.

4.2.2 Extração de OTA: Estudo de Contaminação em Café Verde

Na análise de grãos de café da região Norte do Estado do Paraná, o ic-ELISA validado foi aplicado para o estudo de contaminação natural por OTA em 68 amostras de café verde, por CLAE e ic-ELISA (Figuras 8 a 10).

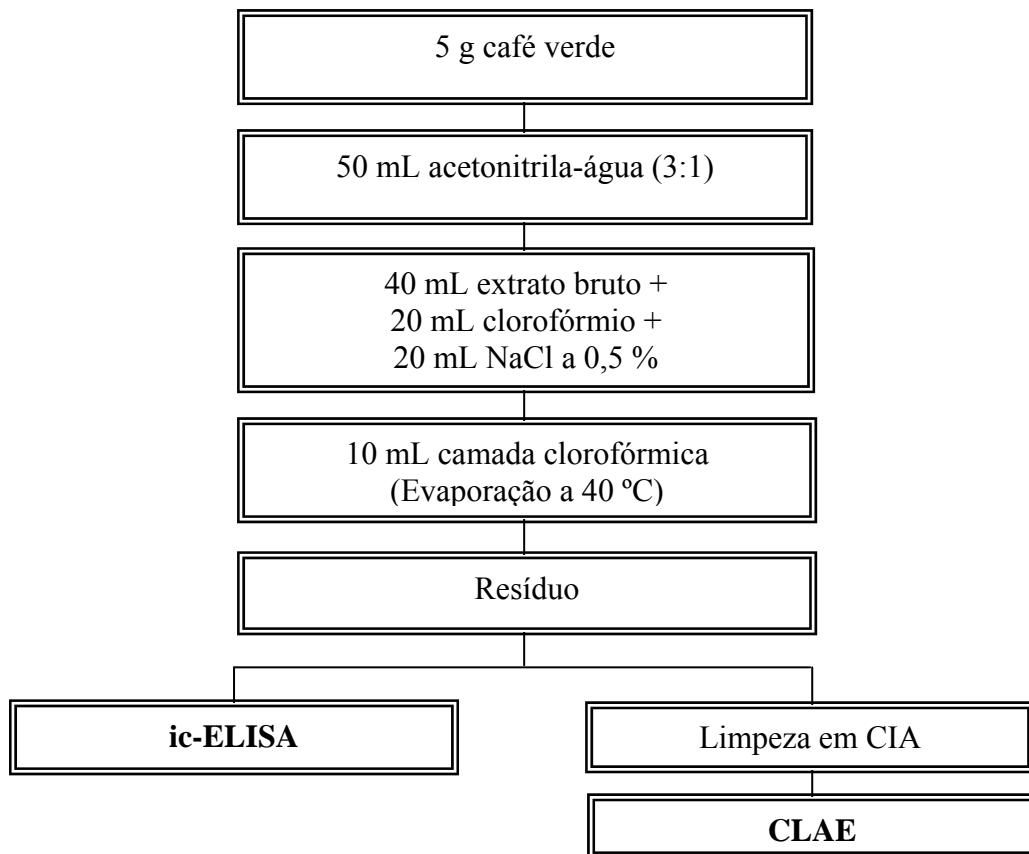


Figura 8 – Extração de OTA para monitoramento de contaminação natural em amostras de café verde do Norte do Paraná.

Fonte: (KAWAMURA et al., 1989 modificado por FUJII et al., 2005)

4.2.3 Limpeza de Amostra por CIA e Quantificação por CLAE

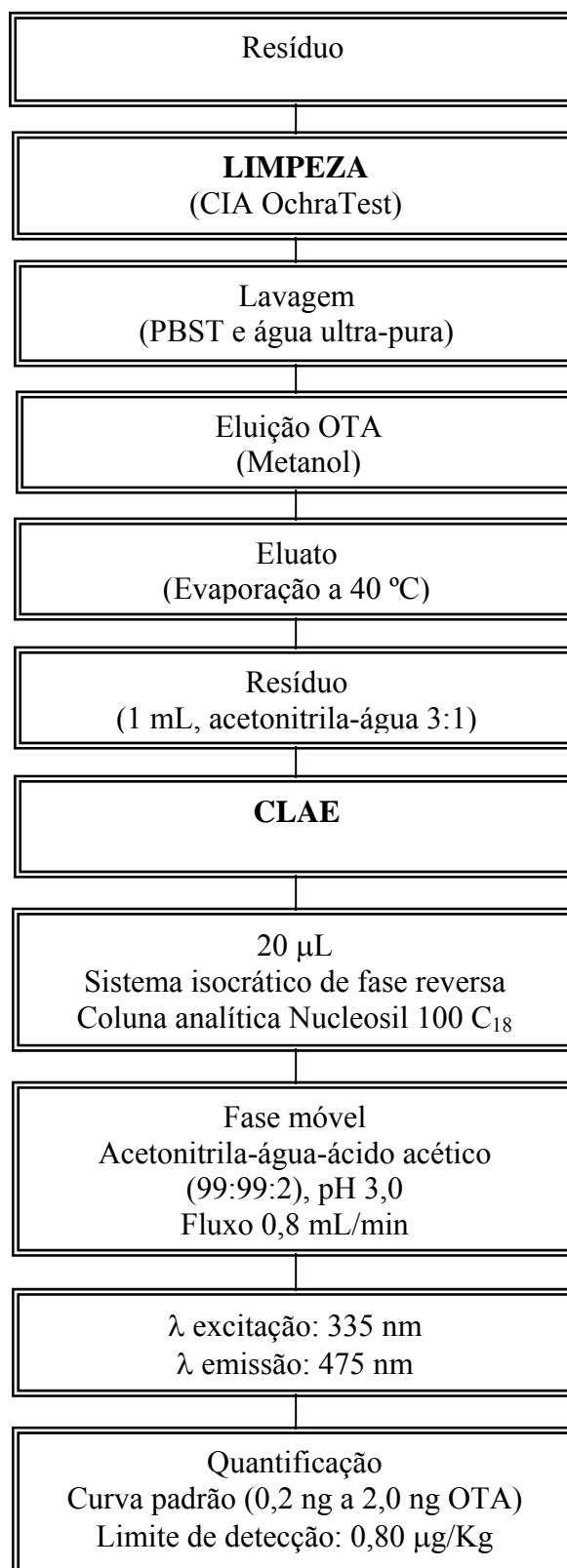


Figura 9 – Limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade e quantificação de OTA por CLAE

Fonte:(PITTET et al., 1996).

4.2.4 Quantificação de OTA por Ic-ELISA

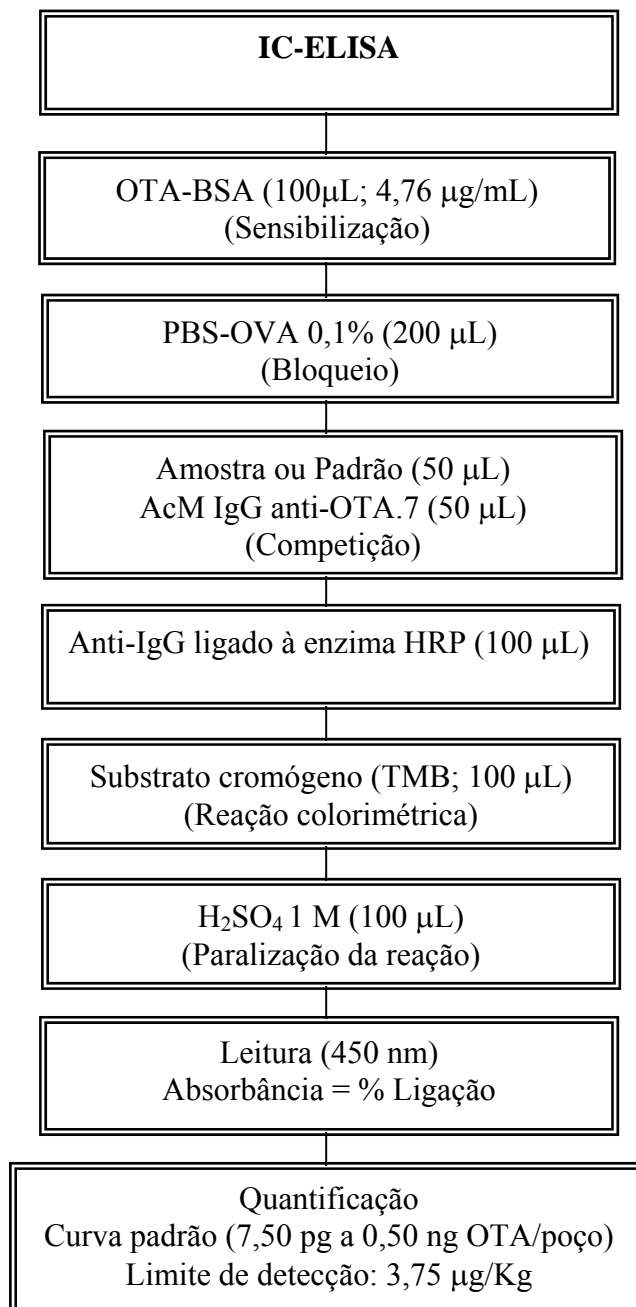


Figura 10– Quantificação de OTA por ic-ELISA

Fonte: (KAWAMURA et al., 1989).

4.2.5 Manutenção de Hibridoma Linhagem OTA.1 para Produção de IgG Anti-OTA

As Figuras de 11 a 13 delineiam a metodologia para cultivo e manutenção de hibridoma OTA.1, assim como a produção e purificação de IgG anti-OTA.1 destinado ao desenvolvimento de CIA baseada em imunossuporte sílica-Hz-IgG, visando análise de OTA.

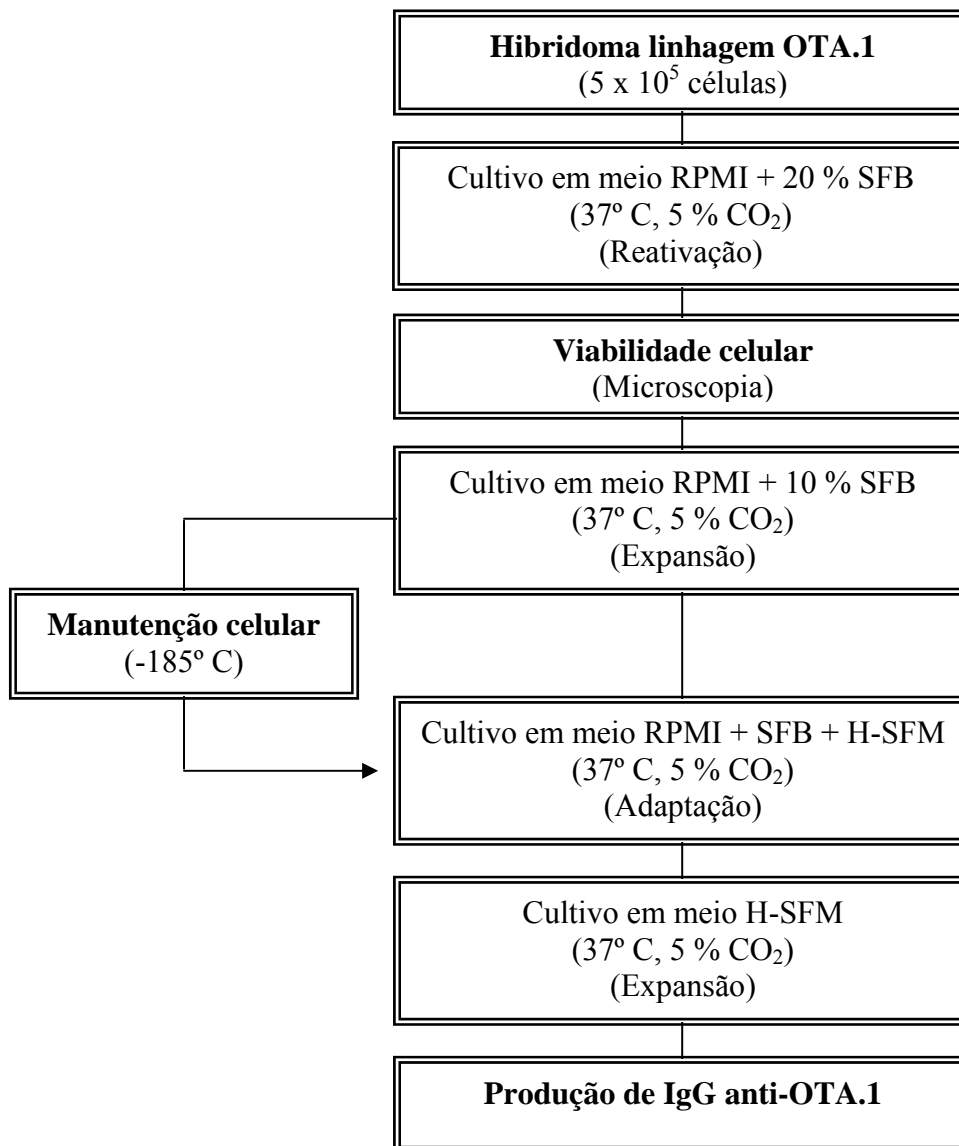


Figura 11 – Reativação, cultivo, expansão e manutenção de hibridoma linhagem OTA.1, visando produção de IgG anti-OTA.

4.2.6 Produção de IgG Anti-OTA.1 em Meio Sintético e Camundongo

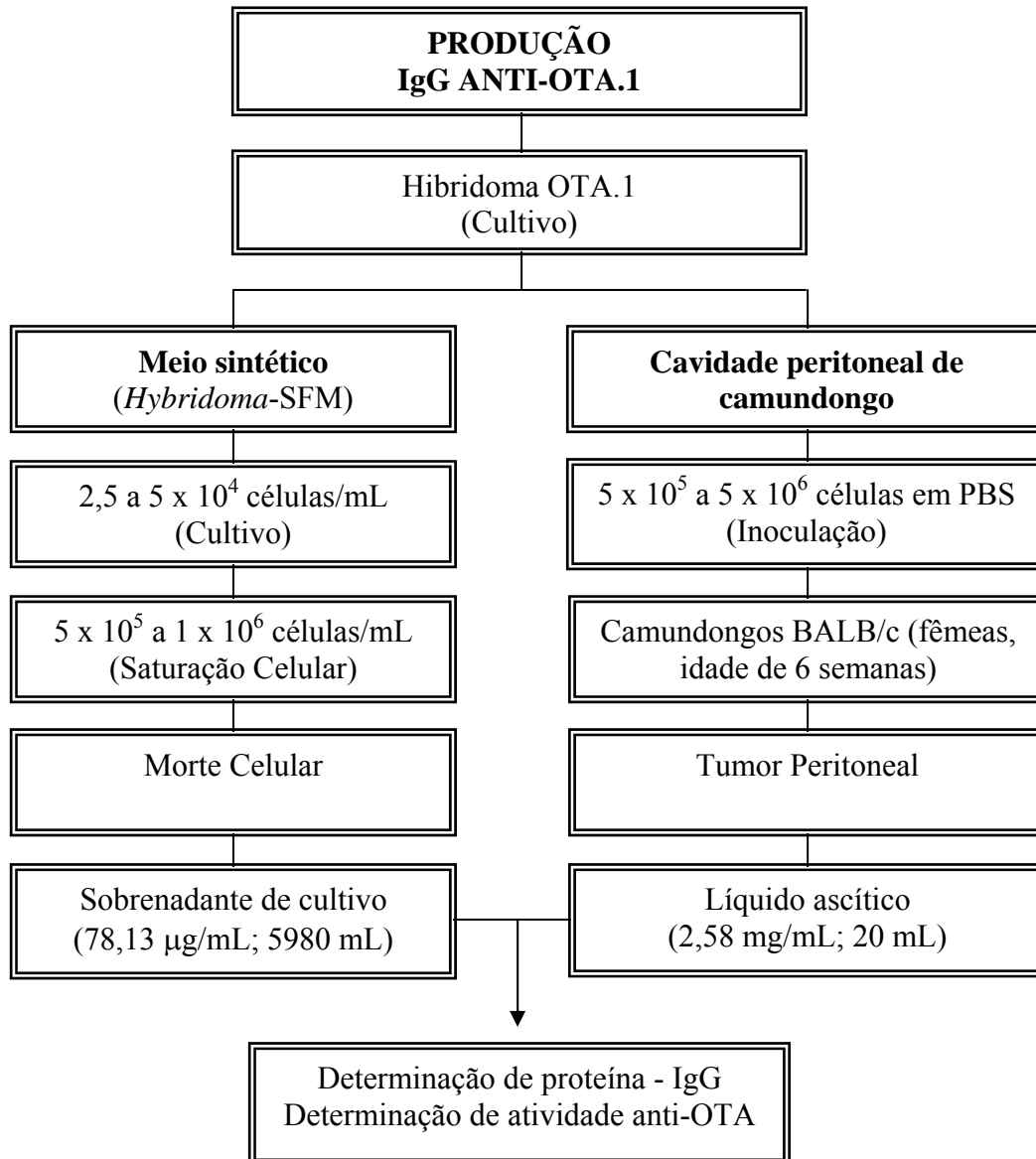


Figura 12 – Produção de IgG anti-OTA.1 em meio sintético e tumor peritoneal de camundongo.

4.2.7 Purificação de IgG Anti-OTA.1

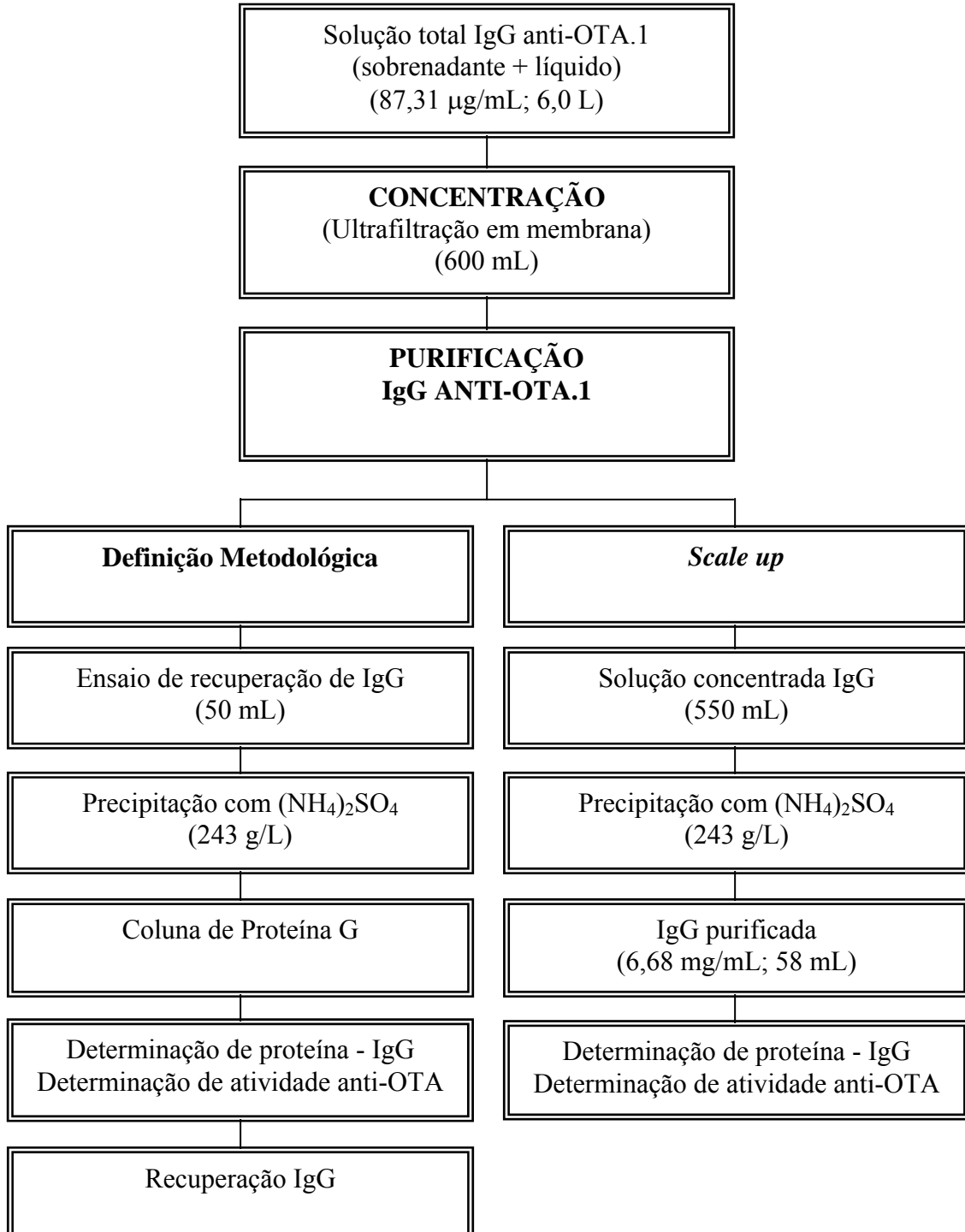


Figura 13 – Purificação de IgG anti-OTA.1: definição metodológica e subsequente *scale up*.

4.2.8 Preparo de imunossuporte sílica-hidrazida-IgG

As Figuras 14 a 16 apresentam o delineamento para a confecção e caracterização da CIA-Hz anti-OTA e o ensaio de validação de CIA-Hz para diferentes matrizes alimentares (arroz, milho, café).

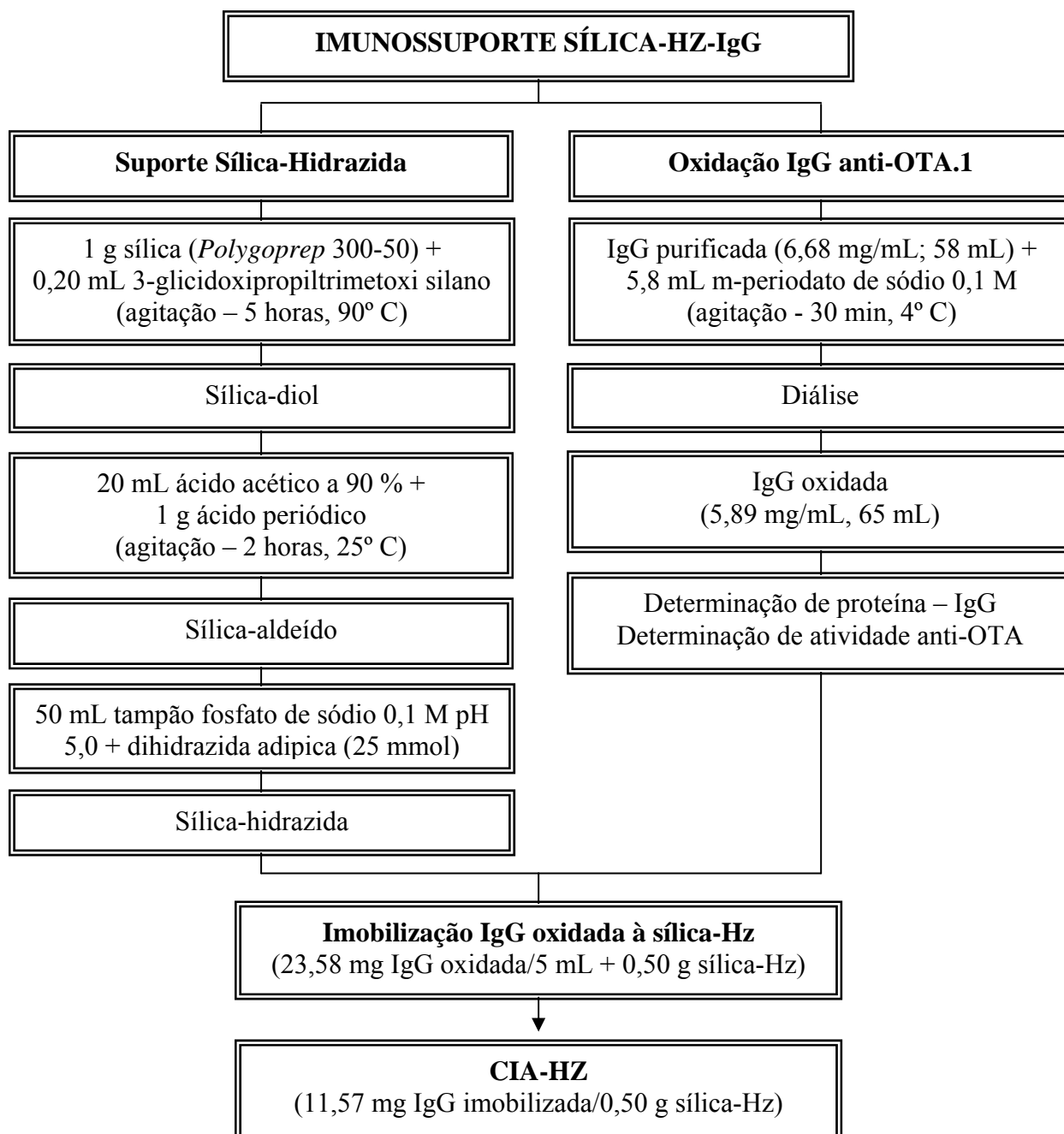


Figura 14 – Preparo de suporte sólido sílica-Hz e oxidação de IgG anti-OTA.1 para confecção de CIA-Hz baseada em imunossuporte sílica-Hz-IgG anti-OTA.

4.2.9 Caracterização de CIA-Hz Anti-OTA

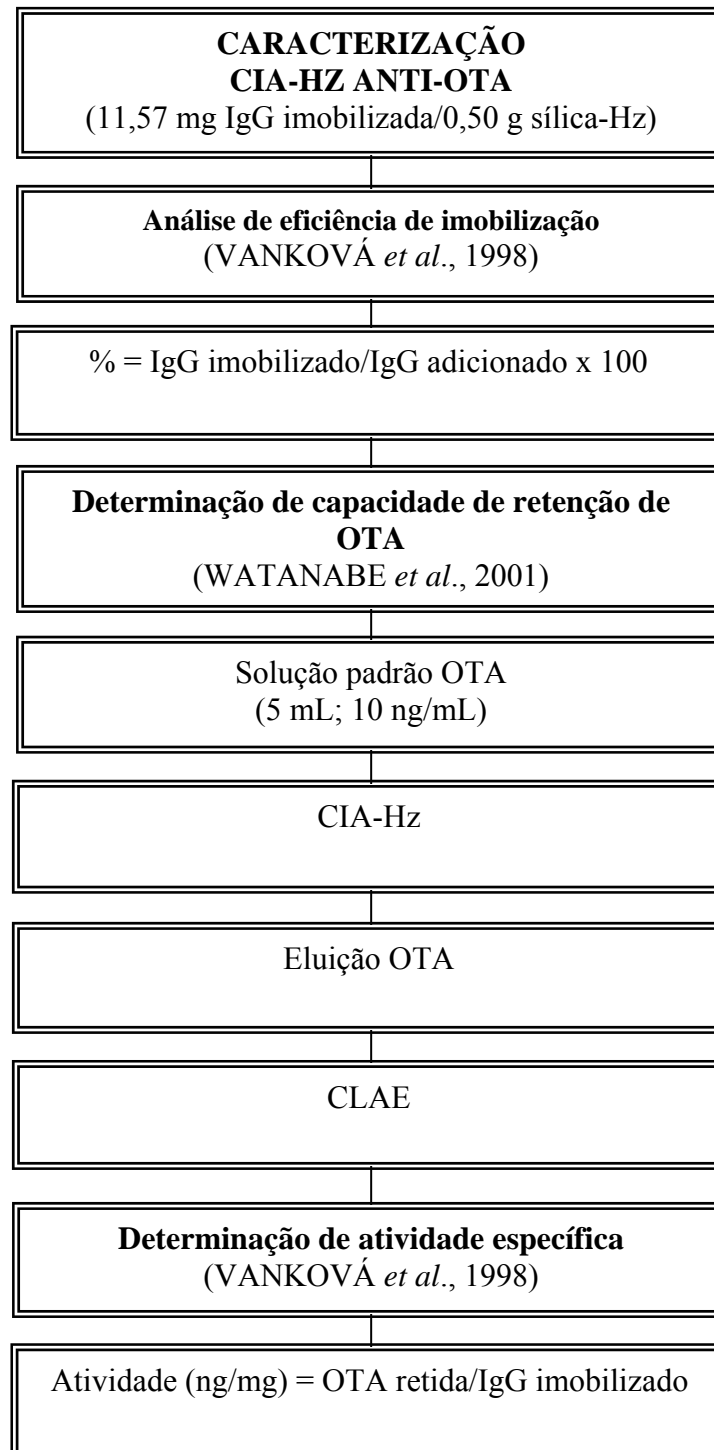


Figura 15 – Caracterização de CIA-Hz quanto à eficiência de imobilização de IgG, retenção de OTA e atividade específica.

4.2.10 Validação de CIA-Hz-IgG Anti-OTA para Diferentes Matrizes Alimentares

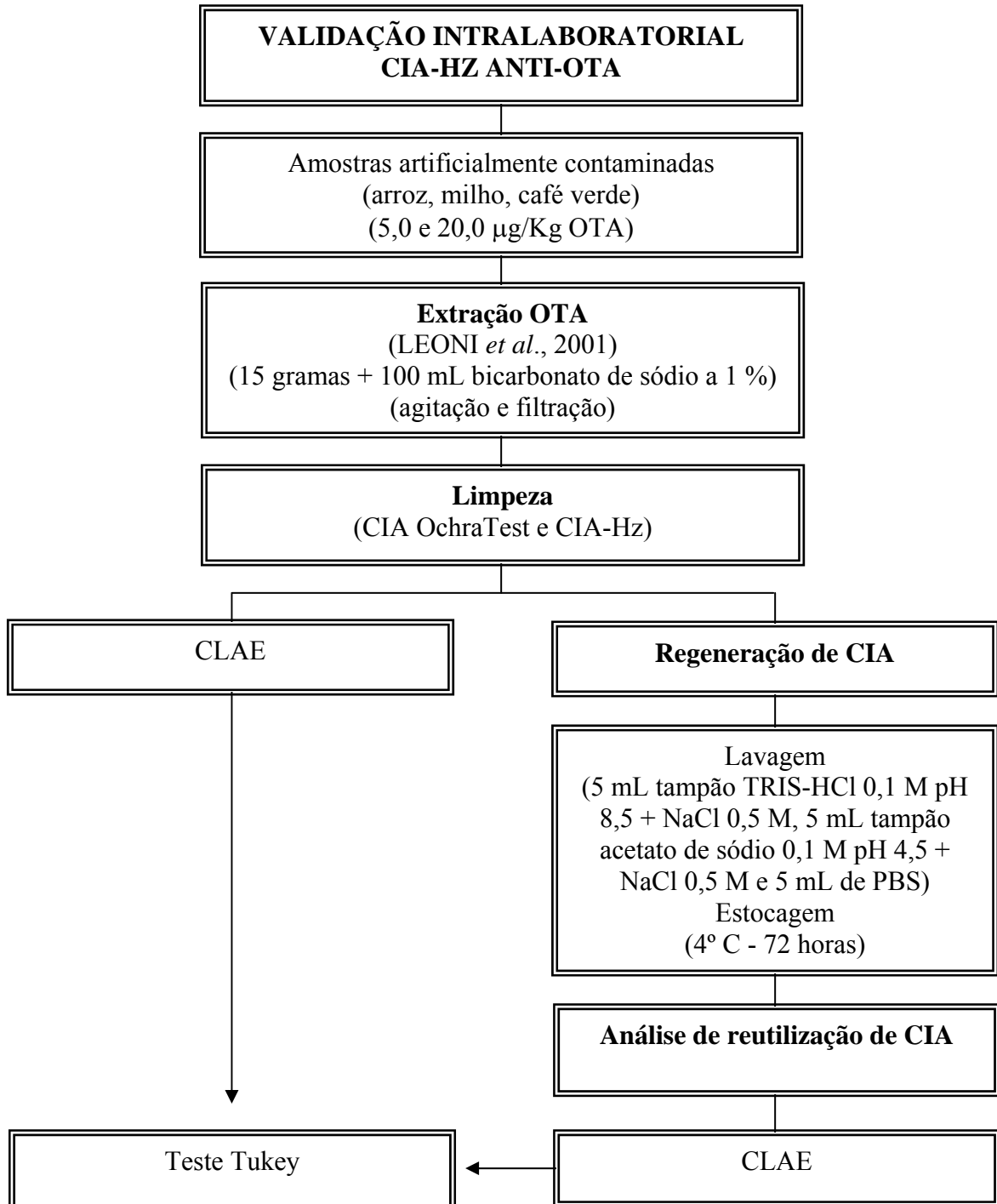


Figura 16 – Validação intralaboratorial de CIA-Hz-IgG anti-OTA para diferentes matrizes alimentares (arroz, milho, café verde).

5 RESULTADOS E DISCUSSAO

Os resultados e discussão foram redigidos sob forma de capítulos para publicação, listados abaixo:

- 5.1 RELIABLE INDIRECT COMPETITIVE ELISA FOR OCHRATOXIN A SURVEY IN GREEN COFFEE FROM THE NORTH OF PARANÁ STATE, BRAZIL** (Food Additives and Contaminants, v. 12, n. 9, p. 902-909, sept/2006).
- 5.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL VISANDO DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO PARA DETECÇÃO DE OTA EM ALIMENTOS**
- 5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE COLUNA DE IMUNOAFINIDADE SÍLICA-HIDRAZIDA-IgG PARA DETECÇÃO DE OTA EM ALIMENTOS**

5.1 RELIABLE INDIRECT COMPETITIVE ELISA FOR OCHRATOXIN A SURVEY IN GREEN COFFEE FROM THE NORTH OF PARANÁ STATE, BRAZIL

FUJII S., RIBEIRO R.M.R., SCHOLZ M.B.DOS S., ONO E.Y.S., PRETE C.E.C., ITANO E.N., UENO Y., KAWAMURA O., HIROOKA E.Y. Reliable indirect competitive ELISA for ochratoxin A survey in green coffee from the North of Paraná State, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 12, n. 9, p. 902-909, sept/2006.

Abstract

The performance of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) based on a monoclonal antibody (mAb) for ochratoxin A (OTA) detection was evaluated in a comparative study with high performance liquid chromatography (HPLC) analysis using 68 freshly harvested coffee samples from the North of Paraná State, Brazil. The anti-OTA mAb showed high specificity and low cross-reactivity with OTA analogues (OTB and OT α), but cross-reacted with OTC. This ic-ELISA showed a detection limit of 3.75 μg OTA/Kg sample, when compared to 0.80 μg /Kg by HPLC, with an ic-ELISA/HPLC correlation coefficient of 0.90. Concerning the OTA analysis of these coffee samples, natural contamination was detected in 10 samples (14.7 %) by both methods, where the ic-ELISA values (range 3.9 to 7.3 μg /Kg) were 1.1 to 1.6-fold higher than HPLC data (2.7 to 4.7 μg /Kg). Five samples (7.4 %) were OTA positive (range 0.84 to 1.30 μg /Kg) only by HPLC assay, probably due to the higher detection limit reached by ic-ELISA. OTA was non-detectable in 53 samples (77.9 %) by both methods, while all positive samples (range 0.84 to 7.30 μg /Kg) showed OTA levels lower than 8 μg /Kg (maximum limit recommended by the European Union). The matrix interference of green coffee was minimized by dilution of sample extracts before carrying out the ELISA assay. This mAb-based ic-ELISA can be effectively applied for OTA screening in coffee, because it is simple, sensitive and sample preparation is easy.

Key words: ochratoxin, immunoassay, HPLC, monoclonal antibody, coffee.

1 Introduction

Ochratoxin A (OTA) producing *Aspergillus* and *Penicillium* species are common fungi in food commodities including cereals, coffee, cocoa, spices, dried fruits, beer, wine and products of animal origin (ACCENSI *et al.*, 2004; HALSTENSEN *et al.*, 2004; BAU *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2005). The main toxicological effects of OTA in animals are nephrotoxicity, immunotoxicity, citotoxicity and genotoxicity (ÁLVAREZ *et al.*, 2004; KAMP *et al.*, 2005; O'BRIEN and DIETRICH, 2005). OTA has been associated with nephropathy in humans, and the International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified it as a group 2B carcinogen, i.e., possibly carcinogenic to humans (IARC, 1993).

The establishment of strict guidelines on the maximum limit of OTA for coffee trading should be associated with accurate monitoring throughout the coffee production chain by exporting countries (van EGMOND, 2004; VARGAS *et al.*, 2004). Studies on OTA levels have been reported in different countries, targeted on safety of green coffee in producing areas (LEONI *et al.*, 2001; SIBANDA *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2003; PARDO *et al.*, 2004).

Validated methods based on liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD) and/or mass spectrometry (LC-MS) have been developed for OTA analysis in different food matrices (BLESA *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2005; REINSCH *et al.*, 2005). However, these methods require extensive clean-up of sample extracts, trained staff, use of harmful solvents, in addition to being time-consuming and costly (SYDENHAM and SHEPHARD, 1996; PITTET and ROYER, 2002; BUTTINGER *et al.*, 2004).

Immunoassays provide an attractive screening tool for OTA detection in food, mainly for simple and rapid quality control in producing areas. The availability of an efficient extraction procedure for chemical analysis, coupled with highly specific polyclonal (pAb) or monoclonal antibodies (mAb) for development of ELISA and immunoaffinity column would improve the sensitivity of analytical methods (HEFLE, 1995; BUSCARLET *et al.*, 2004; SHIM *et al.*, 2004; LOBEAU *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2005).

In the present study, an indirect competitive ELISA (ic-ELISA) based on anti-OTA mAb.7 was developed and evaluated in a comparative study with HPLC to reach a reliable analysis. The developed methodology was applied in a survey of naturally contaminated green coffee beans from the North of Paraná State, Brazil.

2 Material and Methods

2.1 Reagents

Anti-OTA.7 mAb (79.4 % cross-reactivity for OTC in relation to OTA) and OTA-bovine serum albumin were previously prepared and standardized (KAWAMURA *et al.*, 1989). The reagents used were OTA, ovalbumin (OVA), horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (HRP-anti-IgG) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Dojindo, Japan); 30 % hydrogen peroxide (Merck KgaA, Darmstadt, Germany); dimethyl sulfoxide (DMSO) (Trade TCI, Japan); 96-wells microtitre plate (Corning, USA); glass microfiber filter (GF/C 2.5 cm i.d) (Whatman International Ltd.,

Maistone, England); immunoaffinity column OchraTest (Vicom Inc., Watertown, USA) and HPLC grade acetonitrile and acetic acid (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA).

2.2 Samples

Sixty-eight freshly harvested green coffee (*Coffea arabica*, Sachimor Amarelo cultivar) samples were collected during the July-October 2003 crop in the North of Paraná State, Brazil (23°19'00"S; 51°22'00"W-GR, altitude 576 m). Fifty-two samples belonged to Experimental Station of the Agronomic Institute of Paraná (IAPAR, 45 ha of coffee crop), while 16 were randomly sampled in coffee producing local farms by Department of Agronomy (State University of Londrina, UEL - PR). Roasted and instant coffee samples were acquired from local markets and used to evaluate the mAb performance.

2.3 Sample preparation

The OTA extraction was carried out according to KAWAMURA *et al.* (1989) modified by FUJII *et al.* (2005). Green coffee samples (200 g) were previously dried at 50°C for 16 hours to reach 12% moisture content, ground to 48 mesh in a laboratory mill (A10, Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Germany), and kept in polyethylene flasks at -20° C. Five grams of samples (green coffee and coffee-based products) were extracted with 50 mL acetonitrile-water (3:1), shaken at 150 rpm for 10 min and centrifuged at 4000 x g for 10 min. Crude extract (40 mL) was added with 20 mL chloroform and 20 mL 0.5 % NaCl solution and shaken at 150 rpm for 10 min. The chloroform layer (10 mL) was dried under nitrogen stream at 40° C, and the residue was dissolved in adequate solvent previous to immunoaffinity column clean-up for HPLC analysis. For ic-ELISA, the residue was dissolved in methanol-phosphate buffered saline 10 mM, pH 7.4 (PBS) (1:9, 500 µL), diluted 100-fold with the same solvent and analyzed directly without clean-up procedure.

2.4 Ochratoxin analysis by HPLC

OTA was analyzed according to PITTET *et al.* (1996). The coffee residue was dissolved in methanol-1 % sodium bicarbonate (70:30, 2 mL) (green coffee) or 1 % sodium bicarbonate (2 mL) (coffee-based products), and 8 mL PBS-0.01 % Tween 20 (PBST) were added. The crude extracts were filtered (glass microfiber filters GF/C) and applied to an

immunoaffinity column under a flow of 1-2 drops/sec. The column was washed with 10 mL PBST followed by 10 mL ultra-pure water, and ochratoxin was eluted with 1.5 mL methanol. The eluate was evaporated to dryness under nitrogen stream at 40° C, and redissolved in acetonitrile-water (1:1, 1 mL). OTA (20 µL) was analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (LC10-AD pump, RF 535 fluorescence detector, Shimadzu, Japan) using a Nucleosil 100 C₁₈ column (5 µm, 4 x 250 mm, Merck, Germany). Excitation and emission wavelengths were 335 and 475 nm, respectively. The mobile phase was acetonitrile-water-acetic acid (99:99:2) pH 3.0 and the flow rate was 0.80 mL/min. The detection limit for OTA (0.80 µg/Kg) was calculated as 3-fold standard deviation (SD) of the blank sample obtained from seven repetitions (Soares, 2006). OTA concentration was determined using a standard curve ranging from 0.2 to 2.0 ng OTA (10 a 100 ng/mL in acetonitrile-water, 1:1).

2.5 Ochratoxin analysis by ic-ELISA

OTA levels were determined by ic-ELISA using anti-OTA.7 mAb developed by KAWAMURA *et al.* (1989). Microtitre plates were coated with 100 µL OTA-bovine serum albumin (4.76 µg/mL) in 0.1M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6, overnight at 4° C. After washing four times with PBS-0.05 % Tween 20 (PBST), the wells were blocked for 4 h at 25°C with 200 µL 0.1 % ovalbumin in PBS. After washing four times with PBST, 50 µL OTA standard, OTA-related compounds or coffee extracts (100-fold dilution) and 50 µL anti-OTA.7 mAb in PBST were added, and incubation carried out for 18 h at 4° C. After washing four times with PBST, 100 µL HRP-labeled goat anti-mouse IgG were added, incubated at 25° C for 1 h, and washed as previously described. Then, 100 µL TMB substrate solution were added. After 1 h at 25° C, the reaction was stopped by adding 50 µL 1M H₂SO₄ and absorption was estimated at 450 nm (Bio-Tek Instruments ELX800 ELISA reader, USA). Average absorbance was calculated from individual absorbance obtained from triplicate wells and results were expressed as the percentage of binding:

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

where A⁺ was the mean absorbance in the presence of the sample, OTA standard or OTA-related compounds and A⁻ was the mean absorbance in their absence. The detection limit for OTA (3.75 µg/Kg) was calculated as the mean plus 3-fold SD of absorbance from three replicate wells of zero standard (0 ng OTA/well) (Iijima *et al.*, 1996). The OTA concentration

was determined using a standard curve (7.50 pg to 0.50 ng OTA/well; 0.15 to 10.0 ng/mL in methanol-PBS, 1:9), plotting percent binding against the log of OTA amount),

2.6 Cross-reactivity of anti-OTA.7 mAb

The specificity of anti-OTA.7 mAb was determined testing OTA and OTA-related compounds in the ic-ELISA, as above. The OTA analogues tested were ochratoxin C (OTC), (4R)-4-hydroxyochratoxin A (4R-OH-OTA), ochratoxin B (OTB) and ochratoxin α (OT α) (KAWAMURA *et al.*, 1989).

2.7 OTA recovery

Uncontaminated green coffee beans and coffee-based products (less than 0.80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ by HPLC) were spiked with OTA standard solution (500 ng/mL in methanol) to reach 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 and 70.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ of OTA, and the same procedure as described for the samples was followed: extraction (item 2.3), clean-up, HPLC (item 2.4) and ic-ELISA quantification (item 2.5). Recovery tests were based on duplicate spiking and triplicate analysis.

2.8 Correlation analysis of ic-ELISA against HPLC

The correlation between OTA concentrations detected by ic-ELISA and HPLC was analysed by Pearson's correlation test (Statistica software version 5.0, StatSoft Inc., USA) to obtain a linear regression equation and correlation coefficient.

3 Results and Discussion

Figure 1 shows the linear regression analysis of the standard curve carried out by ic-ELISA (7.50 pg to 0.50 ng OTA/well) and the high reproducibility, as indicated by low standard deviations. The detection limit of OTA by ic-ELISA using anti-OTA.7 mAb was 3.75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, corresponding to minimum concentration over 9.3 % inhibition of antibody binding.

The cross-reactivity of anti-OTA.7 mAb with OTA analogues was calculated as OTA/analyte ratio required for 50 % inhibition by ic-ELISA (Table 1). The anti-OTA.7 mAb cross-reacted with OTC (79.4 %), but was far less reactive with 4R-OH-OTA (1.24 %), OTB (0.07 %) and OT α (0.06 %). Nevertheless, OTC has been uncommon in natural food contamination, suggesting minor contribution in assay using this anti-OTA mAb (KAWAMURA *et al.*, 1989).

HPLC and ic-ELISA showed similar performance for OTA detection in green coffee and coffee-based products, as shown in the OTA recovery assay of artificially contaminated samples (Table 2). The green coffee samples spiked with 5 to 70 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ levels of OTA showed recovery ranging from 74.8 % to 93.4 % (mean, 80.5 %) by HPLC, while the values were 55.0 % to 106.1 % (mean, 81.5 %) by ic-ELISA. The ic-ELISA/HPLC ratio of 1.02 and correlation coefficient (r) of 0.98 (Figure 2) calculated from these data indicated the efficiency of anti-OTA.7 mAb based ic-ELISA. These values were comparable with the data reported by ZHENG *et al.* (2005), who reported a 66 % to 84 % recovery range by HPLC and 77 % to 124 % by ELISA, in green coffee samples spiked with 0 to 80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA. LIN *et al.* (2005) reported higher recovery (range 95.4 to 97.3 %) in coffee spiked with 2 to 8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA. Moreover, PITTET *et al.* (1996) obtained recovery of 90 % - 108 % in green coffee samples spiked in a range from 0.5 to 5.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA using immunoaffinity column clean-up prior to HPLC analysis.

However, OTA recovery in coffee-based products (roasted and instant coffee) was low by both ELISA and HPLC. In roasted coffee samples spiked with 10 to 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ of OTA, the recovery rates ranged from 32.7 to 55% (mean, 47 %) by ic-ELISA, and HPLC also showed similar data (45.8 %). The same pattern was obtained from instant coffee data, where the recovery means were 65.1 % (ELISA) and 54.5 % (HPLC) (Table 2). Despite the low recovery rates in coffee-based products, the applicability of immunoassay was supported by an ic-ELISA/HPLC ratio of 1.03 and 1.22, in addition to a correlation coefficient of 0.99 and 0.90 for roasted and instant coffees, respectively (Figure 2).

The low recovery rates in coffee-based products were probably due to the extraction procedure used (acetonitrile-water, 3:1). This extraction process had been previously used in wheat flour (KAWAMURA *et al.*, 1989) and green coffee (FUJII *et al.*, 2005) with adequate performance as it minimized the matrix interference, i.e. effect of these extracts on the binding of anti-OTA mAb to OTA, when the sample was analysed by ic-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1989). However, it was not efficient to extract OTA from

complex matrix as coffee-based products. Improvement in the extraction procedure is in course (coupling 1 % sodium bicarbonate extraction and immunoaffinity column), taking into account that PRADO *et al.* (2000) and LEONI *et al.* (2000) reached OTA recovery from 80 % to 99.7 % using sodium bicarbonate as extraction solution and quantification by HPLC.

Natural OTA contamination in green coffee samples from the North of Paraná State is shown in Table 3. Taking into account the overall set of data (68 samples), HPLC detected OTA in 15 (22.1 %) coffee samples, with a mean level of 2.85 µg/Kg (range 0.84 to 4.70 µg/Kg), while ic-ELISA showed contamination in 10 (14.7 %) samples, with a mean value of 5.28 µg/Kg (range 3.90 to 7.30 µg/Kg). OTA was non-detectable in 53 (77.9 %) samples by HPLC and 58 (85.3 %) samples by ELISA (Table 4). The higher number of positive samples by HPLC can be explained by its lower detection limit (0.80 µg/Kg), when compared to ic-ELISA (3.75 µg/Kg). However, the occurrence of “false negative” samples by ic-ELISA does not invalidate the immunoassay, as its detection limit was lower than the maximum residue limit (MRL) recommended by the European Union (8 µg/Kg). In contrast, the higher mean OTA levels detected by ic-ELISA than by HPLC were probably due to food matrix interference in the immunoassay (overestimation) and additional recovery loss during clean-up step in HPLC (PESTKA *et al.*, 1994; ONO *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2005).

Food matrix interference in the ELISA could be due to non-specific interaction caused by protein levels, or steric hindrance of antibody-epitope binding by large molecules, which would overestimate the real toxin level (HEFLE, 1995; PESTKA *et al.*, 1995). Diluting the sample extract prior to ELISA could minimize the matrix effect, therefore OTA analysis by ic-ELISA was carried out starting with dilution at 1/100 (FUJII *et al.*, 2006a).

OTA levels (range 0.84 to 7.30 µg/Kg) in these coffee samples, as shown in Table 3, were lower than the MRL of 8 µg/Kg recommended by the European Common Market for exportation of raw coffee (SIBANDA *et al.*, 2001; MICOTOXINAS ON LINE, 2006; FAO, 2006). Moreover, these data indicated lower OTA contamination when compared with other reports in Brazilian coffee (LEONI *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2003), as well as in other countries (SIBANDA *et al.*, 2001; PARDO *et al.*, 2004). MARTINS *et al.* (2003) with OTA detected levels ranging from 0.2 to 7.3 µg/Kg (mean, 2.38 µg/Kg) by HPLC in 33.3 % of 60 green coffee samples imported from Brazil. LEONI *et al.* (2001) reported OTA levels ranging from 0.7 to 47.8 µg/Kg (mean, 7.1 µg/Kg) in 20.5 % of 132 Brazilian green coffee samples from five producing states (Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Espírito Santo

and Bahia). PARDO *et al.* (2004) detected OTA levels $>8 \mu\text{g/Kg}$ in 40.3 % of 57 green coffee samples from Africa, America and Asia, with significantly higher levels in African samples (mean, $10.9 \mu\text{g/Kg}$) than American ($5.4 \mu\text{g/Kg}$) or Asian ($6.0 \mu\text{g/Kg}$). SIBANDA *et al.* (2001) detected OTA ranging from 27 to $168 \mu\text{g/Kg}$ in 5 out of 22 samples in a survey of green coffee from different countries.

As shown in Table 3, only 3 (4.4 %) samples collected from IAPAR were OTA positive at levels ranging from 0.84 to $1.07 \mu\text{g/Kg}$ (mean, $0.95 \mu\text{g/Kg}$), whereas 12 (17.6 %) samples from local farms were OTA positive (range of 1.20 to $4.07 \mu\text{g/Kg}$, mean of $3.32 \mu\text{g/Kg}$). These results indicated that despite the occurrence of potentially toxigenic fungi detected in previous study (FUJII *et al.*, 2006a), such a profile could not be associated with high OTA contamination if the post-harvest of coffee grains had been carefully handled. I.e., the critical point control should be targeted at coffee production and the post-harvest stage (URBANO *et al.*, 2001).

Naturally contaminated coffee samples ($n = 68$) were also evaluated for the ic-ELISA/HPLC ratio (Table 4), where the OTA levels in 10 (14.7 %) positive samples by both methods were 1.1 to 1.6-fold higher by ic-ELISA than HPLC data. These data were similar to spiked green coffee samples (ic-ELISA/HPLC ratio of 1.02, Figure 2), indicating good performance of ic-ELISA based on mAb in natural contamination survey, which do not require the clean-up step during sample preparation. These ic-ELISA/HPLC ratios (1.1 to 1.6, table 4) were lower than data reported by ZHENG *et al.* (2005) in green coffee samples (ratio of 1.1 to 2.5) using commercial ELISA (OTA ELISA test kit, AgraQuant®, Romer Labs, Asia) for OTA analysis.

HPLC and ELISA data of natural OTA contamination in green coffee samples ($n = 10$) showed correlation coefficient (r) of 0.90, calculated by the linear equation $y = 0.5451x + 0.8519$, when compared to 0.98 in artificially contaminated green coffee samples. Such correlation between ic-ELISA and HPLC can demonstrate the effective use of anti-OTA.7 mAb in coffee grain and coffee-based product analysis.

This anti-OTA.7 mAb-based ic-ELISA can be effectively applied in OTA screening of green coffee, with advantages of simplicity, sensitivity, without clean-up or concentration step. Quality control performed with reliable immunoassay should be essential to assure the safety of the end product in the coffee trading, which has to be associated with good harvesting, drying and storage practices.

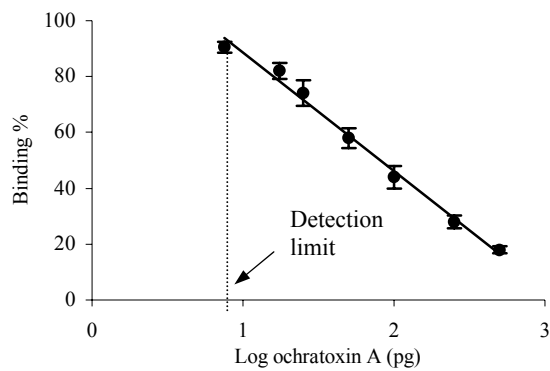


Figure 1 –Standard curve of OTA detection by ic-ELISA. Each point and corresponding bars (standard deviation) were the mean binding data from seven standard curves carried out on different days during 1-month. The detection limit was 7.50 pg OTA/well, which was the minimum concentration over 9.3 % inhibition (3-fold SD at 0 ng OTA/well) detected by ic-ELISA, corresponding to 3.75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA in coffee beans.

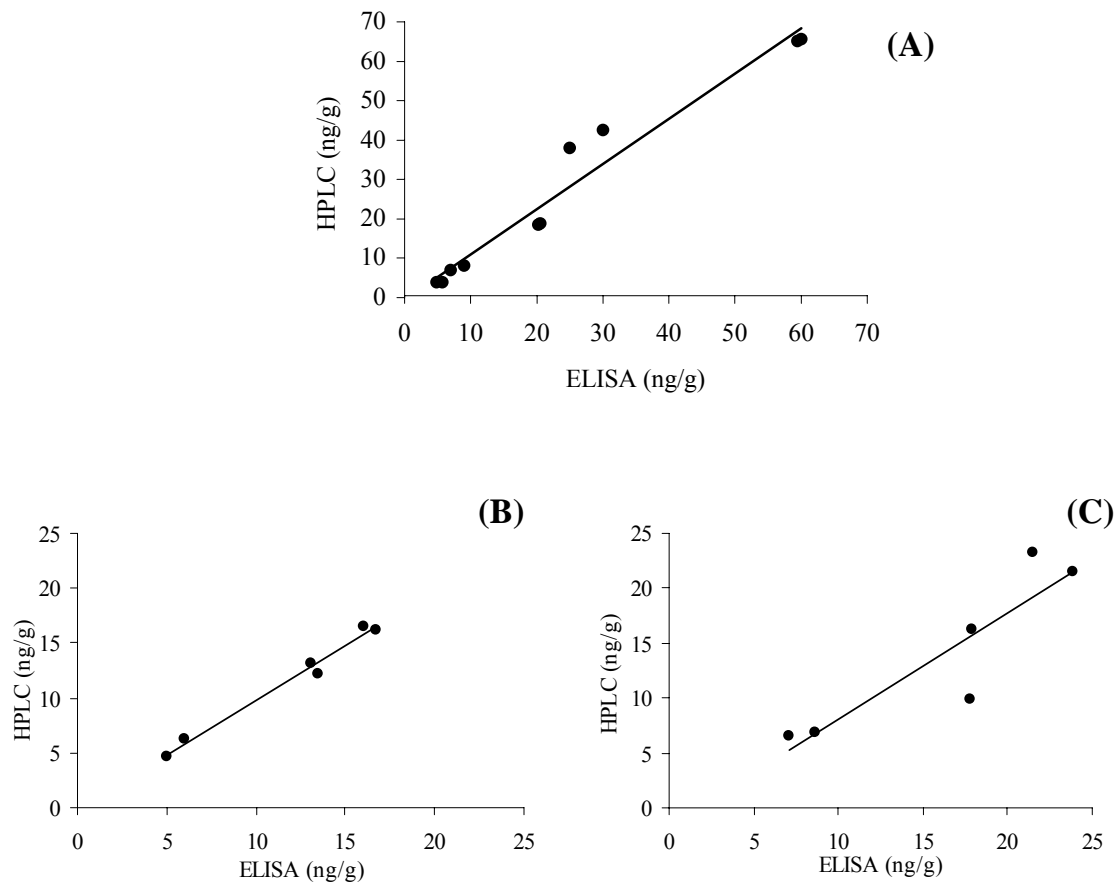


Figure 2 – HPLC and ic-ELISA correlation data for OTA detection in artificially contaminated green coffee and coffee-based products (5 to 70 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA). Axes x and y correspond to OTA concentration ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) determined independently by ic-ELISA and HPLC, respectively. (A) Green coffee: correlation coefficient (0.98) was calculated by linear regression equation $y = 1.148x - 0.57$ and the ic-ELISA/HPLC ratio was of 1.02. (B) Roasted coffee: correlation coefficient (0.99), linear regression equation ($y = 1.0212x - 0.3677$), ic-ELISA/HPLC ratio (1.03), (C) Instant coffee: correlation coefficient (0.90), linear regression equation ($y = 0.9645x - 1.5704$), ic-ELISA/HPLC ratio (1.22).

Table 1 – Cross-reactivity of anti-OTA mAb with OTA analogues

OTA analogues	Cross-reactivity (%)
	Anti-OTA.7 mAb
OTA	100.0*
OTC	79.4
(4 R)-OH-OTA	1.24
OTB	1.07
OT α	0.06

* Percentage of cross-reactivity calculated as OTA required for 50% binding inhibition / OTA analogues required for 50% binding inhibition x 100 (KAWAMURA *et al.*, 1989).

Table 2 – Recovery of OTA from spiked green coffee and coffee-based products, by HPLC and ic-ELISA

Coffee	OTA added ($\mu\text{g/Kg}$) ^b	HPLC ^a (%)			Ic-ELISA ^a (%)		
		Recovery	CV	Recovery (mean)	Recovery	CV	Recovery (mean)
Green	5	77.9 \pm 1.3	1.6		106.1 \pm 12.6	11.9	
	10	75.9 \pm 8.5	11.2		79.8 \pm 13.9	17.4	
	25	74.8 \pm 1.1	1.5	80.5 \pm 8.0	81.4 \pm 0.8	1.0	81.5 \pm 18.4
	50	80.6 \pm 6.6	8.1		55.0 \pm 7.1	12.9	
	70	93.4 \pm 0.6	0.7		85.3 \pm 0.6	0.7	
Roasted	10	54.0 \pm 11.7	21.7		55.0 \pm 7.1	12.9	
	25	50.6 \pm 3.0	6.0	45.8 \pm 11.6	53.2 \pm 1.1	2.1	47.0 \pm 11.5
	50	32.8 \pm 0.5	1.4		32.7 \pm 1.0	3.0	
Instant	10	67.1 \pm 2.6	3.9		78.5 \pm 10.6	13.5	
	25	51.9 \pm 18.0	34.7	54.5 \pm 13.1	71.5 \pm 0.4	0.6	65.1 \pm 16.4
	50	44.6 \pm 8.5	5.4		45.4 \pm 3.3	7.4	

^a Each result represents the mean \pm SD of six determinations (duplicate spiking, triplicate analysis); ^b OTA added to coffee previously analyzed by HPLC (< 0.80 $\mu\text{g/Kg}$ OTA level).

Table 3 – Natural occurrence of OTA in freshly harvested coffee samples from the North of Paraná State (2003 crop) evaluated by HPLC and ic-ELISA

Site	Number (%)	HPLC			Ic-ELISA		
		Positive ^a	OTA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) ^b		Positive ^a	OTA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) ^b	
			Range	Mean		Range	Mean
Private	16	12	1.20 – 4.70	3.32	10	3.90 – 7.30	5.28
Government	52	3	0.84 – 1.07	0.95	n.d. ^c	n.d.	n.d.
Total	68	15	0.84 – 4.70	2.85	10	3.90 – 7.30	5.28

^a Detection limits - HPLC (0.80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA); ic-ELISA (3.75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA); ^b Each result represents the mean of three determinations; ^c n.d.: not detected.

Table 4 – Ic-ELISA / HPLC ratio in 68 freshly harvested green coffee samples

Ic-ELISA/HPLC ^a	Number of samples	%	OTA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) ^b	
			Ic-ELISA	HPLC
n.d./n.d. ^c	53	77.9	n.d.	n.d.
n.d./d.	5	7.4	n.d.	1.30 ± 0.20
			n.d.	1.20 ± 0.30
			n.d.	1.07 ± 0.40
			n.d.	0.84 ± 0.20
			n.d.	0.94 ± 0.20
d./d. (1.1 – 1.6) ^d	10	10.7	6.70 ± 0.40	4.40 ± 0.30
			4.00 ± 0.10	2.70 ± 0.20
			4.60 ± 0.20	3.50 ± 0.30
			3.90 ± 0.20	2.70 ± 0.10
			4.50 ± 0.10	3.10 ± 0.10
			4.30 ± 1.30	3.90 ± 0.60
			7.30 ± 0.60	4.60 ± 0.30
			7.00 ± 0.20	4.70 ± 0.20
			4.60 ± 0.40	3.20 ± 0.30
			5.90 ± 0.20	4.54 ± 0.20

^a Detection limits - HPLC ($0.80 \mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA); ic-ELISA ($3.75 \mu\text{g}/\text{Kg}$ OTA); ^b Each result represents the mean \pm SD of three determinations; ^c n.d.: not detected; d.: detected.; ^d Ic-ELISA/HPLC ratio range.

5.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL VISANDO DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO PARA DETECÇÃO DE OTA EM ALIMENTOS

1 Introdução

A ocratoxina A (OTA) pertence ao grupo de metabólito secundário produzido por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., com relevante envolvimento em intoxicação clínica e subclínica animal, assim como na etiologia de doença humana (FINK-GREMMELS *et al.*, 1995; ACCENSI *et al.*, 2004; BAU *et al.*, 2005). As propriedades toxicológicas incluem efeitos nefrotóxico, teratogênico, citotóxico, imunotóxico, genotóxico e imunossupressor, sendo classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) no grupo 2B, i.e. possivelmente carcinogênico para humanos (IARC, 1993; FINK-GREMMELS *et al.*, 1995; KAMP *et al.*, 2005).

Devido à toxicidade e ocorrência natural numa variedade de produtos agrícolas, o monitoramento de OTA empregando método analítico eficiente e viável é fundamental para o controle de qualidade (WHITAKER, 2003). Técnicas imunológicas baseadas em diferentes modalidades de ensaio imunoenzimático como *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e cromatografia de imunoafinidade tornaram-se alternativas atraentes na análise de alimento, oferecendo triagem rápida e resultado quantitativo confiável com alto grau de sensibilidade (CHU, 1984; HEFLE 1995; ZHENG *et al.*, 2005).

O avanço na tecnologia de hibridomas permitiu o fornecimento ilimitado de anticorpo monoclonal específico (AcM) de alta qualidade (alta afinidade e especificidade, baixa reatividade cruzada) e passível de ser empregado na padronização de métodos a serem utilizados na rotina laboratorial (HARLOW; LANE, 1988a; LA PINE; HILL, 2001; NAKANO; NAGATA, 2003). Aliado a este fator, o processo de purificação de anticorpo tem sido etapa essencial para viabilizar técnicas imunológicas, contribuindo na redução de interações inespecíficas (HARLOW; LANE, 1988c). A limitação do uso de ensaios imunológicos para o monitoramento da contaminação de produtos brasileiros é devido à dependência da importação de *kits*, baseados em anticorpos policlonais (AcPs) ou monoclonais (AcMs) com alta especificidade e sensibilidade (CHU, 1984; GAZZAZ *et al.*, 1992).

Considerando que a produção de imunorreagentes tornou-se assunto prioritário para minimizar a dependência atual de importação e o custo de aplicação no

controle de qualidade, este trabalho se propõe a produzir AcM IgG anti-OTA a partir do cultivo de hibridoma específico, destinado ao desenvolvimento de ensaio imunológico.

2 Material e Métodos

2.1 Cultivo e manutenção de hibridoma específico para OTA

2.1.1 Linhagem de célula de hibridoma

A célula de hibridoma consistiu de linhagem OTA.1 secretora de AcM (isotipo IgG₁ kappa) específico para OTA e reativo com OTC (63,1 %). O hibridoma foi derivado de mieloma linhagem Sp2/0-Ag14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, produzido por Kawamura *et al.* (1989) em *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo* e mantido em *Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão*.

Camundongo BALB/c foi imunizado com conjugado OTA-BSA e as células esplênicas obtidas foram fundidas com células de mieloma (linhagem SP2/0-Ag14). Os hibridomas foram selecionados no 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 i-ELISA quanto à presença de AcM anti-OTA. Os clones positivos foram clonados por método de diluição limitante e expandidos em meio de cultura com posterior preservação em N₂ líquido (-185° C).

O hibridoma OTA.1, secretor de AcM IgG₁ anti-OTA, foi selecionado baseado no melhor perfil quanto à especificidade e reatividade cruzada e, encaminhado ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, UEL – PR).

2.1.2 Recepção e cultivo de hibridoma

Um cultivo celular correspondente a 5×10^5 hibridomas foi gentilmente fornecido por Dr. Osamu Kawamura (*Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão*) para a continuidade de estudo no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCA, UEL – PR).

Imediatamente após a recepção, as células híbridas foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia (Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL – PR) para prosseguir com a reativação e cultivo. Os hibridomas foram avaliados quanto à viabilidade celular (item 2.1.2.1) e reativados em meio RPMI 1640 (Gibco Co., USA) suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco Co., USA) em microplacas de 24 orifícios (Corning, USA), a 37° C (incubadora sob 5 % CO₂, Forma Scientific, USA). Após reativação, as células foram expandidas em frascos de 25 e 75 cm² (Nunc, Denmark) utilizando meio RPMI com 10 % de SFB e avaliadas quanto à produção de IgG anti-OTA por ELISA indireto (i-ELISA) (item 2.2.4). (HARLOW; LANE, 1988b; KAWAMURA, informação pessoal). O crescimento celular foi monitorado diariamente por microscopia.

2.1.2.1 Contagem e análise de viabilidade celular

A contagem e viabilidade de hibridomas foram avaliadas microscopicamente utilizando corante vital Azul de Trypan (Acros Organics, USA) (HARLOW e LANE, 1988b). Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi combinada a 100 µL da solução de corante (0,25 % em meio RPMI 1640, p/v) e as células viáveis (aptas a excluir corante, i.e. refringentes, com citoplasma homogêneo e membrana íntegra) (Figura 1) foram contadas em câmara de Neubauer:

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

2.1.3 Manutenção e recuperação de hibridoma

Os hibridomas reativados e expandidos em meio RPMI com 10 % de SFB (item 2.1.2) foram preservados em nitrogênio líquido (-185° C) utilizando SFB adicionado de crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) na proporção de 9:1 (HARLOW; LANE, 1988b; KAWAMURA, informação pessoal). Com esta finalidade, as células foram centrifugadas (200x g, 5 min) e ressuspendidas em solução de SFB-DMSO (9:1) resfriadas a 4° C. Alíquotas de 0,5 mL desta suspensão contendo 2,5 x 10⁶ a 2,5 x 10⁷ células viáveis foram distribuídas em criotubos (Corning, USA), mantidas a -70° C por 16 horas (freezer CFC FREE, Sanyo, USA), e transferidas para recipiente de nitrogênio líquido (-185° C) (Cryo Diffusion, France).

Para uso, os hibridomas congelados à -185° C em nitrogênio líquido foram recuperados por descongelamento rápido do criotubo em banho de água a 37° C, lavados com 5 mL de meio RPMI a 37° C e centrifugados (200x g, 5 min). As células recuperadas foram avaliadas microscopicamente com corante vital Azul de Trypan e a viabilidade celular pós-congelamento calculada e expressa como porcentagem:

Viabilidade (%) = (células viáveis pós-congelamento / células viáveis pré-congelamento) x 100

2.2 Produção de anticorpo monoclonal IgG anti-OTA

2.2.1 Produção de IgG empregando cultivo de hibridoma em meio sintético

Os hibridomas foram cultivados inicialmente em meio RPMI 1640 com 10 % SFB (37° C, 5 % CO₂), seguido de adaptação gradual por adição de 25, 50 e 75 % de meio *Hybridoma-SFM (serum free medium)* (H-SFM) (Gibco Co., USA) suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina (Gibco Co., USA) (BRUCE *et al.*, 2002; KAWAMURA, informação pessoal). As células adaptadas (inóculo de 2,5 a 5 x 10⁴ células/mL) foram cultivadas em frascos de 150 cm² (Nunc, Denmark) contendo 100 mL de meio H-SFM até saturação celular (5 x 10⁵ a 1 x 10⁶ células/mL, por aproximadamente 4 dias) e removidas por centrifugação (200x g, 5 min). Este sobrenadante do cultivo foi novamente inoculado com 2,5 a 5 x 10⁴ células/mL e mantido sem substituição do meio por 15 dias para saturação celular seguido de morte (HARLOW; LANE, 1988b; BRUCE *et al.*, 2002). Após morte celular, o cultivo foi centrifugado (2400x g, 10 min a 4° C) e o volume total de sobrenadante avaliado quanto à concentração protéica (item 2.2.3) e atividade anti-OTA (item 2.2.4), seguido de manutenção a 4° C.

2.2.2 Produção de IgG em tumor peritoneal de camundongo

Camundongo BALB/c fêmea de 6 semanas (4 animais) foi inoculado via intraperitoneal com 0,5 mL de Pristane (2,6,10,14 ácido tetrametil-decanóico) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após 14 dias, 5 x 10⁵ a 5 x 10⁶ hibridomas previamente centrifugados (200x g, 5 min) e lavados em PBS (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4) foram ressuspensos em 0,5 mL de PBS e inoculados na cavidade peritoneal do camundongo. Após 6 a 10 dias, o líquido ascítico foi coletado, incubado a 37° C por 1 hora (BOD TE-391, Tecnal, Brasil) e mantido a 4° C por 16 horas (HARLOW; LANE, 1988b).

Posteriormente, o líquido foi centrifugado (2400x g, 10 min a 4° C) e o *pool* obtido (20 mL) avaliado quanto à concentração protéica (item 2.2.3) e atividade anti-OTA (item 2.2.4), seguido de manutenção a -20° C.

2.2.3 Determinação de proteínas (IgG)

A concentração de proteínas (IgG) foi determinada por absorção a 280 nm (Espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20, GMB, Brasil), adotando coeficiente de absorção (E_{280}) de 1,35 para IgG (LAYNE, 1957; HARLOW e LANE, 1988e):

Concentração IgG (mg/mL) = absorbância a 280 nm / coeficiente de absorção

2.2.4 Determinação de atividade anti-OTA

A presença de IgG anti-OTA no sobrenadante de cultura de hibridomas em meio sintético e no líquido ascítico foi determinada por i-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1989) em microplaca de poliestireno (96 poços) revestida com 100 µL de solução de conjugado OTA-BSA (0,79 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6. A microplaca foi adicionada de 100 µL de amostra, incubada (4° C - 18 horas) e lavada com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20). Após lavagem, 100 µL de conjugado anti-IgG ligado a HRP (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi adicionado, seguido de incubação (25° C - 1 hora) e reação com substrato cromógeno TMB (25° C - 1 hora) (Dojindo, Japan). A reação enzimática foi paralisada com 100 µL de H₂SO₄ 1 M e a absorbância lida a 450 nm (leitora de ELISA, Bio-Tek *Instruments* ELX800, USA).

2.3 Purificação de anticorpo monoclonal IgG anti-OTA

2.3.1 Precipitação de IgG com sulfato de amônio

IgG anti-OTA produzida no sobrenadante do cultivo celular (5980 mL) e líquido ascítico (20 mL) foram combinadas obtendo um *pool* de 6,0 L. O *pool* de IgG foi previamente submetido à concentração por ultrafiltração (sistema *Stirred Cell* 8400, Millipore Co., Bedford, MA, USA) utilizando membranas de exclusão molecular de 100 Kda (YM 100, celulose, Millipore Co., Bedford, MA, USA).

A solução concentrada (550 mL) foi adicionada de sulfato de amônio (243 g/L de sobrenadante) sob agitação lenta até concentração final de 40 % de saturação para precipitação e purificação parcial de IgG. O precipitado protéico foi mantido a 4° C por 16 horas sob agitação, centrifugado (8000x g, 30 min a 4° C) e ressuspenso em 55 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 ($1/10$ do volume original da amostra concentrada). A amostra suspensa foi dialisada (*cut-off* de 12000-16000 MM) contra tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 (4 x 1 L) a 4° C por 16 horas (HARLOW; LANE, 1988c; VANKOVÁ *et al.*, 1998). Após diálise, a concentração de IgG e a atividade anti-OTA foram determinadas conforme os itens 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente.

O dializado (58 mL) foi analisado quanto ao grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme método de Laemmli (1970) e mantido a -20° C.

2.3.2 Purificação de IgG em coluna de proteína G

A purificação de IgG em coluna de Proteína G foi conduzida exclusivamente para avaliar a recuperação, conforme o item 2.3.3. A solução de IgG precipitada por sulfato de amônio foi aplicada na coluna de *Sepharose* Proteína G (Amersham Biosciences, Sweden), conforme recomendado pelo fabricante. A amostra foi diluída (1:1) em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 e aplicada na coluna de Proteína G pré-equilibrada com o mesmo tampão. Após lavagem de coluna com 20 mL de PBS, as frações contendo IgG foram eluídas a 4° C com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,7 e coletadas em volumes de 1,0 mL, seguida de imediata correção do pH do eluato com tampão TRIS-HCl 1,0 M pH 9,0. As frações foram lidas a 280 nm e aquelas contendo os maiores valores de absorvância foram combinadas e dialisadas (*cut-off* 12000-16000 MM) contra PBS a 4° C por 16 horas (3 x 1 L). Após diálise, a concentração de IgG e a atividade anti-OTA foram determinadas conforme os itens 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente e a solução purificada mantida a -20° C.

2.3.3 Recuperação de IgG pós-purificação

A recuperação e perda de IgG após cada etapa de purificação foram avaliadas conforme descrito por McKinney e Parkinson (1987), visando seleção do método de purificação para prosseguir com *scale up* (produção total de IgG).

Um volume de 50 mL da solução concentrada de IgG (ultrafiltração) foi precipitado com sulfato de amônio, seguido de aplicação em coluna de Proteína G, conforme descrito nos itens 2.3.1 e 2.3.2. Após cada etapa de purificação, os AcMs foram ressuspendidos para o volume original (50 mL) em PBS. A concentração protéica e a atividade anti-OTA pré e pós-purificação foram determinadas conforme os itens 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente. Para o imunoenensaio, alíquotas da solução de IgG, pré e pós-purificação, foram diluídas em série em PBS ($1/2$ a $1/6000$) e adicionadas (100 μ L) em microplacas de poliestireno sensibilizadas com o conjugado OTA-BSA (item 2.2.4).

3 Resultados e Discussão

3.1 Cultivo e manutenção de hibridoma específico para OTA

A Tabela 1 apresenta a contagem, viabilidade celular e atividade anti-OTA do hibridoma OTA.1, da recepção à produção de IgG anti-OTA. O transporte de hibridoma acarretou em perda de 88,79 % de viabilidade celular, restando apenas $5,6 \times 10^4$ células viáveis ($3,7 \times 10^3$ células/mL) destinadas à imediata reativação. A exaustão de nutrientes (ex., glicose), acúmulo de produtos inibitórios provenientes do metabolismo (ex., lactato) e restrição da disponibilidade de CO₂ e oxigênio constituíram fatores relevantes para a baixa viabilidade celular (11,21 %) durante transporte (LEGAZPI *et al.*, 2005).

O cultivo celular exaurido de nutrientes foi reativado em meio RPMI suplementado com 20 % SFB, a 37° C sob 5 % de CO₂. Após 2 dias, a expansão celular no fator de 3 vezes ($3,7 \times 10^3$ para $1,1 \times 10^4$ células/mL, Tabela 1) indicou adaptação às condições de cultivo, com ênfase na recuperação de características morfológicas (aspecto membranar e citoplasmático).

A suplementação do cultivo (RPMI 1640) com soro fetal bovino foi essencial na recuperação celular. O soro tem sido utilizado como estimulante de crescimento na rotina de cultivo de hibridoma por fornecer fatores hormonais e proteínas carreadoras de hormônios, minerais, lipídeos e outros nutrientes essenciais (LIDDELL; CRYER, 1991; HARLOW; LANE, 1988B; LEGAZPI *et al.*, 2005).

Os hibridomas reativados foram cultivados por 3 a 4 dias (10 % SFB, 37° C, 5 % de CO₂) e avaliados quanto à manutenção da capacidade produtora de IgG anti-OTA por i-ELISA. O cultivo celular atingiu contagem de $6,7 \times 10^5$ células/mL, correspondente a uma expansão de 60 vezes (contagem inicial, $1,1 \times 10^4$ células/mL) e, apresentou atividade anti-

OTA confirmando síntese de IgG (i-ELISA) (Tabela 1). A expansão celular foi destinada à produção de AcM anti-OTA e à conservação de hibridomas em N₂ líquido (-185° C), utilizando SFB-DMSO (9:1) como agente crioprotetor.

A criopreservação mantém a característica biológica do hibridoma, incluindo a capacidade de produção de anticorpo monoclonal, por longo período (anos), além de garantir alta eficiência na recuperação (HARLOW; LANE, 1988b). Esta etapa requereu alta contagem de células viáveis em fase logarítmica ($5,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^7$ células/mL) para obter congelamento adequado, assim como maior recuperação pós-estocagem (HARLOW; LANE, 1988b). Embora o DMSO exerça efeito crioprotetor, a interação com a membrana celular pode acarretar toxicidade e dano celular (WEWETZER; DILMAGHANI, 2001). Conseqüentemente, o uso de DMSO a 4° C na fase de pré-congelamento, acoplado ao mínimo de contato celular constituem fatores relevantes para minimizar a toxicidade (WEWETZER; DILMAGHANI, 2001)

A viabilidade celular após 60 dias de preservação foi de 65,31 %, com a redução na contagem de $9,8 \times 10^6$ células/mL para $6,4 \times 10^6$ células/mL (tabela 1). Em longo período de estocagem (540 dias), a viabilidade celular decaiu para 35,70 % com a contagem variando de $1,2 \times 10^7$ células/mL para $4,4 \times 10^6$ células/mL. Embora os resultados indicassem baixo valor na viabilidade celular pós-criopreservação (65,31 e 35,70 %), a contagem de $4,4$ a $6,4 \times 10^6$ células recuperadas/mL foi suficiente para prosseguir com a etapa de expansão. Nesta fase, as células oriundas da criopreservação, assim como as mantidas no meio RPMI (10 % SFB) foram adaptadas gradualmente durante 5 dias em meio *Hybridoma*-SFM (H-SFM), caracterizado por ausência de SFB, baixa concentração de proteína (20 µg/ml de insulina e transferrina) e, suplementado com antibióticos e L-glutamina (2 mM). Os hibridomas recuperados (pós-manutenção a -185°C) atingiram o perfil de crescimento e atividade anti-OTA similar às células mantidas em constante expansão no meio RPMI (10 % SFB), garantindo a eficiência do processo de manutenção celular (Tabela 1).

O cultivo de hibridomas no meio H-SFM eliminou problemas relacionados ao uso de SFB, i.e. alto custo, heterogeneidade entre lotes e alto teor protéico, que interfere na purificação de AcM (LIDDELL; CRYER, 1991; BRUCE *et al.*, 2002; LEGAZPI *et al.*, 2005). O aminoácido L-glutamina tem sido apontado como estimulante da produção de anticorpo por hibridomas sendo, portanto incorporado no cultivo (BRUCE *et al.*, 2002; LEGAZPI *et al.*, 2005; HEILMANN *et al.*, 2005). Legazpi *et al.* (2005) dobraram a concentração final de AcM adicionando glutamina (1,4 mM) no meio sem SFB para produção de IgG₁ anti-lactoferrina bovina.

As células adaptadas ao meio H-SFM foram destinadas à produção de AcMs específicos para OTA.

3.2 Produção e purificação de IgG anti-OTA

Os hibridomas OTA.1 foram cultivados no meio H-SFM e na cavidade peritoneal de camundongo, obtendo-se IgG anti-OTA produzida no sobrenadante do cultivo em meio sintético e líquido ascítico, respectivamente.

O líquido ascítico foi coletado de 4 camundongos previamente inoculados com 5×10^5 a 5×10^6 células (1×10^6 a 1×10^7 células/mL) (Tabela 1), totalizando 20 mL com concentração protéica de 2,58 mg/mL e atividade anti-OTA confirmada por i-ELISA (Tabelas 1 e 2). A produção de IgG em tumor peritoneal constitui método prático e acessível à rotina laboratorial, proporcionando alta concentração de anticorpo específico (0,9 – 9,0 mg/mL). Entretanto, as limitações técnicas referentes à infra-estrutura na manutenção de animais, considerações éticas para uso experimental, além da presença de hemáceas, fibrina e proteínas inespecíficas no líquido ascítico, capazes de dificultar a purificação, justificam o avanço na prática do cultivo de hibridomas em meio sintético livre de SFB (BRUCE *et al.*, 2002).

A produção de IgG em ampla escala foi conduzida em frascos contendo meio H-SFM inoculado com 2,5 a $5,0 \times 10^4$ células/mL e mantida sob cultivo estático por 15 dias, sem substituição do meio, até acarretar na morte celular (Tabela 1, Figura 2). O processo de cultivo, representado na Figura 2 (células do hibridoma em processo de contagem), resultou em total de 5980 mL de sobrenadante de cultura celular, com proteína equivalente a 78,13 µg/mL e atividade anti-OTA confirmada por i-ELISA (Tabelas 1 e 2). Embora o cultivo de hibridomas em meio sintético forneça baixa concentração de IgG (50 µg/mL) (HARLOW e LANE, 1988b), o uso de L-glutamina, aliado à técnica de cultivo até morte celular permitiram aumento na produção de proteína (78,13 µg/mL).

A Tabela 2 apresenta a concentração protéica e atividade anti-OTA durante os sucessivos tratamentos nas etapas de definição do método de purificação e subsequente *scale-up*. Em suma, o volume total de 6,0 L de AcM anti-OTA produzido apresentou IgG com concentração protéica de 87,31 µg/mL, compreendendo sobrenadante de cultivo celular (5980 mL) e líquido ascítico (20 mL), totalizando 523,86 mg de proteína.

O volume de 6,0 L (87,31 $\mu\text{g/mL}$) foi reduzido para 600 mL por ultrafiltração, aumentando a concentração de proteína no fator de 9,6 vezes (838,16 $\mu\text{g/mL}$), para prosseguir com a etapa de purificação.

A definição do método de purificação foi conduzida procedendo ao ensaio de recuperação de IgG com sulfato de amônio e coluna de proteína G. O método de precipitação com sulfato de amônio apresentou recuperação de 83,78 % de IgG (35,11 mg) em relação à quantidade de proteína inicial (41,91 mg). Mckinney e Parkinson (1987) obtiveram recuperação de 80 a 90 % da fração IgG presente no soro de coelho, sem perda significativa da atividade biológica, utilizando purificação por precipitação com ácido caprílico e sulfato de amônio.

Em contraste, a purificação seqüencial por afinidade em coluna de proteína G acarretou em perda de 30,19 mg de IgG (72,04 %) e baixa recuperação (27,96 %; 11,72 mg) em relação à quantidade de proteína inicial.

A proteína G imobilizada à matriz sólida é um polipeptídeo da parede celular de estreptococo β -hemolítico do grupo C e G, capaz de interagir com as regiões constantes do domínio Fc da molécula de IgG (HARLOW; LANE, 1988d). Considerando que IgG₁ anti-OTA apresente afinidade adequada à proteína G, a baixa recuperação obtida (27,96 %) foi atribuída à provável desnaturação ou modificação estrutural da proteína G durante o uso da coluna. Soma-se ainda a possível perda deste reagente por tratamento e manutenção inadequados da coluna (HARLOW; LANE, 1988d).

A Figura 3 demonstra a manutenção da atividade anti-OTA de IgG após cada etapa de purificação, com retenção de 80,82 % (pós-sulfato) e 62,42 % (pós-coluna G) procedendo à i-ELISA com amostra diluída no fator de 100 vezes ($1/100$) (Tabela 2). A redução na atividade anti-OTA foi justificada pela perda na quantidade de IgG, aliada à provável inativação de AcM no decorrer da purificação, que envolveu precipitação, agitação, centrifugação e exposição a valores extremos de pH.

Considerando a inviabilidade da purificação de AcM empregando coluna de proteína G, resumida em ineficácia na recuperação e alto custo, a obtenção de alta quantidade de IgG purificado (*scale up*) foi conduzida empregando sulfato de amônio. A precipitação de proteínas com sulfato de amônio caracteriza-se por simplicidade e baixo custo, constituindo técnica de concentração e purificação parcial de anticorpos (HARLOW; LANE, 1988c).

Os resultados obtidos no ensaio de recuperação de IgG pós-purificação (83,78 %, Tabela 2), aliado ao baixo teor de contaminante protéico no meio H-SFM

estimularam a aplicabilidade da técnica como etapa única na purificação de AcM, confirmado por ausência de proteínas interferentes em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (dados não apresentados). Sendo assim, o processo de purificação de IgG anti-OTA resultou em volume final de 58 mL de amostra com concentração de 6,68 mg/mL, totalizando 387,23 mg de IgG purificada (Tabela 2).

Os sucessivos tratamentos da solução original de IgG (6,0 L; 87,31 µg/mL), envolvendo ultrafiltração e purificação, acarretaram em aumento no fator de 76,5 vezes com recuperação de 73,92 % (387,23 mg) da quantidade de IgG e retenção de 80,82 % da atividade anti-OTA.

4 Conclusão

Em suma, a prática de cultivo de hibridoma OTA.1 associada às etapas de tratamentos de IgG, embora laboriosas, mostra que há possibilidade de produção ilimitada de AcM específico a ser utilizado na padronização de ELISA e CIA. Isto indica que se a metodologia for otimizada haveria diminuição da dependência de importação de *kits* imunológicos e conseqüentemente do custo das análises de alimentos e matérias primas realizados nos laboratórios de controle de qualidade.

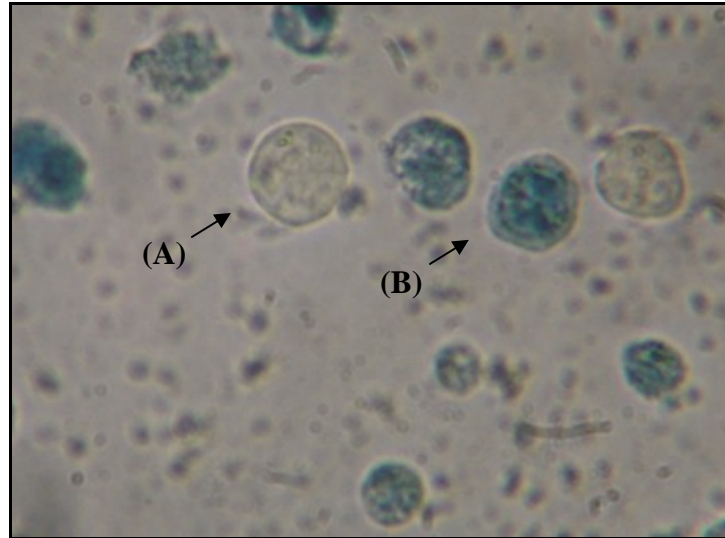


Figura 1 – Viabilidade de hibridoma OTA.1 por microscopia utilizando corante vital Azul de Trypan. (A) Célula viável caracteriza-se por exclusão do corante (refringência), citoplasma homogêneo e membrana íntegra com aspecto liso; (B) Célula morta cora-se com Azul de Trypan.

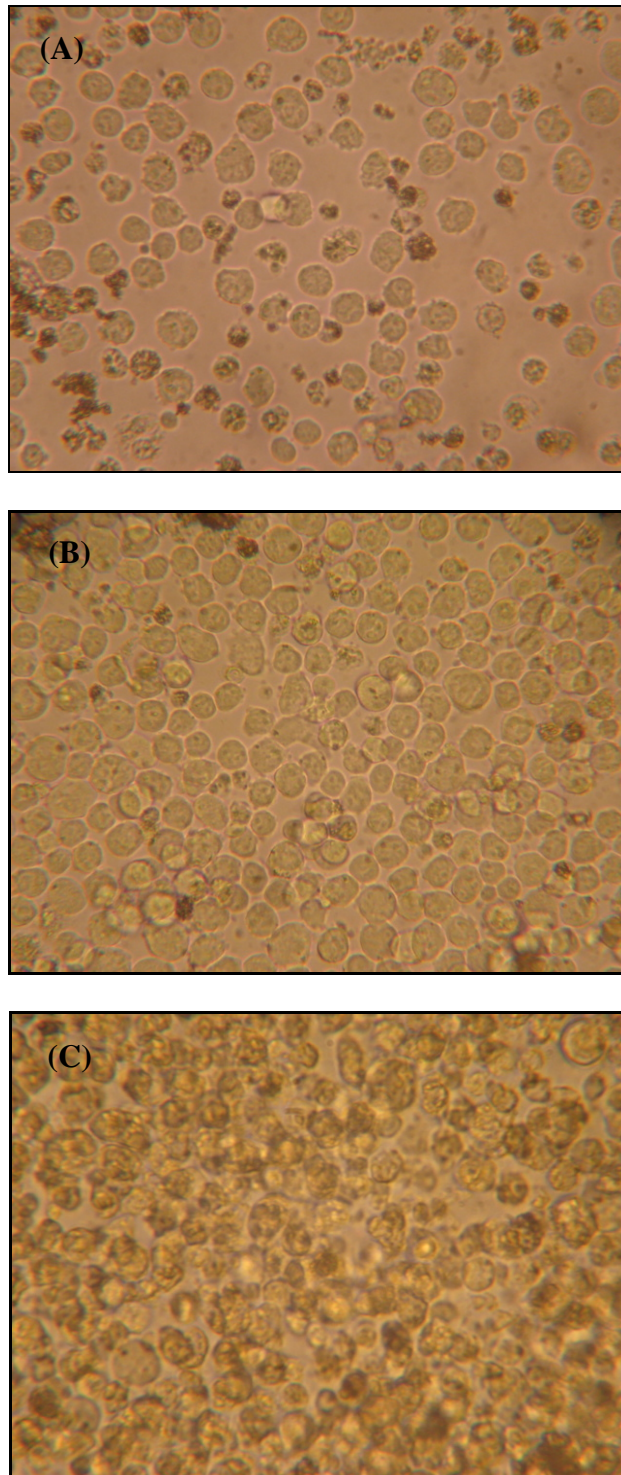


Figura 2 – Vista microscópica de células de hibridoma OTA.1 em meio *Hybridoma*-SFM (aumento de 10 vezes). (A) Contagem inicial ($2,5$ a $5,0 \times 10^4$ células/mL); (B) Saturação celular, após 3-4 dias de cultivo (5×10^5 a 1×10^6 células/mL); (C) Morte celular, após 15 dias de cultivo sem substituição do meio.

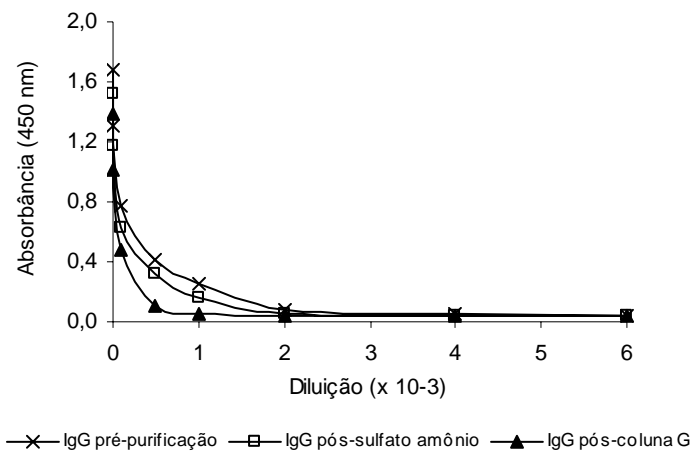


Figura 3 – Atividade anti-OTA de IgG produzida por hibridoma OTA.1 durante purificação (pré, pós-sulfato de amônio e pós-coluna de Proteína G), determinada por i-ELISA. O eixo X representa a diluição seriada de IgG ($1/2$ a $1/6000$), enquanto que Y representa a leitura de absorbância a 450 nm.

Tabela 1 – Contagem, viabilidade celular e atividade anti-OTA do hibridoma OTA.1 nas sucessivas etapas de tratamento celular para implementar produção de IgG anti-OTA

Etapas	Condições			Contagem (células viáveis/mL) ^f		Viabilidade celular (%) ^g	Atividade anti-OTA ^h
	Temperatura (° C)	Tempo (dias)	Meio de cultivo	Inicial	Final		
Transporte ^a	Ambiente	4	RPMI + 10 % SFB	3,3 x 10 ⁴	3,7 x 10 ³	11,21	n.a
Reativação	37° / 5 % CO ₂	2	RPMI + 20 % SFB	3,7 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	n.a	n.a
Expansão	37° / 5 % CO ₂	3 - 4	RPMI + 10 % SFB	1,1 x 10 ⁴	6,7 x 10 ⁵	n.a	+
Manutenção ^b	-185°	60	SFB - DMSO (9:1)	9,8 x 10 ⁶	6,4 x 10 ⁶	65,31	n.a
	-185°	540	SFB - DMSO (9:1)	1,2 x 10 ⁷	4,4 x 10 ⁶	35,70	n.a
Expansão pós-manutenção	37° / 5 % CO ₂	6	RPMI + SFB + H-SFM	4,4 a 6,4 x 10 ⁴	4,8 x 10 ⁵	n.a	+
Produção IgG	37° / 5 % CO ₂ ^c	15	<i>Hybridoma</i> -SFM ^e	2,5 a 5,0 x 10 ⁴	n.a	n.a	+
	Corporal ^d	6 - 10	Cavidade Peritoneal	1 x 10 ⁶ a 10 ⁷	n.a	n.a	+

^aTrajetória Japão-Brasil: Envio de hibridoma OTA 1 produzido na *Science University of Tokyo*, Japão por KAWAMURA et al. (1989) e subsequente recepção pela Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina-PR); ^b Preservação de hibridomas viáveis em nitrogênio líquido (-185° C); ^c Produção de IgG empregando cultivo de hibridomas em meio sintético; ^d Produção de IgG a partir de tumor peritoneal em camundongos (líquido ascítico); ^e *Hybridoma*-SFM suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e L-glutamina (2 mM); ^f Contagem de células viáveis em câmara Neubauer utilizando corante Azul de Trypan, no início e final de cada etapa; ^g Contagem final de células viáveis em relação à contagem celular inicial em cada etapa; ^h Confirmação de atividade anti-OTA por i-ELISA, após cada etapa (n.a: não analisado).

Tabela 2 – Produção e purificação de IgG: concentração protéica e atividade anti-OTA na etapa de definição metodológica e subsequente *scale-up*

Etapa	Ensaio	Tratamento	Volume (mL)	Proteína (IgG)			Atividade anti-OTA (%) ^d
				Concentração ^b (mg/mL)	Total (mg)	Recuperação ^c (%)	
Definição	Recuperação	Pós-Ultrafiltração	50	0,838	41,91	100,00	100
Metodológica	pós-purificação ^a	Pós-(NH ₄) ₂ SO ₄	50	0,702	35,11	83,78	80,82
		Pós-Coluna G	50	0,234	11,72	27,96	62,42
<i>Scale up</i>	Produção total de IgG	Pré-Ultrafiltração ^e	6000	0,087	523,86	100,00	n.a
		Pós-Ultrafiltração	550	0,838	460,99	88,00	100
		Pós-(NH ₄) ₂ SO ₄	58	6,676	387,23	73,92	80,82

^a Recuperação de IgG após cada etapa de purificação (precipitação com sulfato de amônio e coluna de proteína G) (MCKINNEY e PARKINSON, 1987); ^b Concentração protéica determinada por absorção a 280 nm; ^c Total de proteína (IgG, mg) em cada tratamento em relação ao total inicial; ^d Absorção a 450 nm de IgG anti-OTA em cada tratamento em relação à absorção de IgG inicial, determinada por i-ELISA; ^e Total de proteína no sobrenadante de cultivo (78,13 µg/mL, 5980 mL) e líquido ascítico de camundongo (2,58 mg/mL, 20 mL).

5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE COLUNA DE IMUNOAFINIDADE SÍLICA-HIDRAZIDA-IgG PARA DETECÇÃO DE OTA EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES

1 Introdução

A OTA é uma micotoxina com potencial nefrotóxico, teratogênico, citotóxico, genotóxico e carcinogênico produzida por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., fungos contaminantes de uma variedade de produtos agrícolas (IARC, 1993; FINK-GREMMELS *et al.*, 1995; KAMP *et al.*, 2005).

Baseado na toxicologia e frequência natural em alimentos, diversos países regulamentaram limites máximos para OTA, sendo 5 µg/Kg para cereal cru, 3 µg/Kg (derivados de cereais), 10 µg/Kg (frutas secas), 5 a 20 µg/Kg (café verde), 5 µg/Kg (café torrado), 10 µg/Kg (café instantâneo), 2 µg/Kg (vinho, suco de uva) e 0,5 µg/Kg (alimento infantil e dietético) (EUROPEAN COMMISSION, 2005; FAO, 2006). A exigência em nível residual requer monitoramento analítico empregando nanotécnica para o controle de qualidade (WHITAKER, 2003). O método oficial descrito em AOAC *International* para quantificação de OTA é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), cuja eficiência depende de extensiva limpeza para a remoção de impurezas e concentração de analito alvo (SYDENHAM; SHEPHARD, 1996; VALENTA, 1998).

A cromatografia de imunoafinidade empregando anticorpo policlonal (AcP) ou monoclonal (AcM) tem sido ferramenta indispensável no preparo de analito isento de impurezas, conferindo rapidez e praticidade na análise de micotoxinas. O fato tem estimulado o avanço no desenvolvimento de imunossuporte com alta atividade específica, estabilidade e seletividade, cuja eficiência depende do procedimento de ativação de matriz e acoplamento de ligantes específicos (WIMALASENA; WILSON, 1991; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; SHELVER *et al.*, 2002).

A perda de reatividade do imunossuporte, devido a imobilização aleatória de anticorpo à fase sólida (via grupo amino, carboxil ou sulfidril livre), estimulou o acoplamento direcionado de IgG (via molécula de carboidrato ou grupo tiol), permitindo a acessibilidade estérica do sítio Fab ao antígeno. Tal fato reduz o efeito de orientação inadequada, desnaturação, ou fixação de anticorpo em pontos múltiplos da superfície sólida, garantindo maior eficiência (WIMALASENA; WILSON, 1991; GERING *et al.*, 2002).

Considerando o acima foi realizado estudo para desenvolver e validar uma coluna de imunoafinidade baseada em sílica ativada com grupos hidrazida (sílica-Hz) e AcM IgG anti-OTA.1, para determinação de OTA em diferentes matrizes alimentares, visando contribuir com a produção de imunossuporte destinado ao amplo atendimento no controle de qualidade.

2 Material e Métodos

2.1 Desenvolvimento de CIA baseada em imunossuporte sílica-hidrazida-IgG

2.1.1 Produção e purificação de IgG anti-OTA

Hibridoma linhagem OTA.1 foi cultivado em cavidade peritoneal de camundongo (4 animais), assim como em meio sintético *Hybridoma-SFM (serum free medium)* (Gibco Co., USA) suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina (Gibco Co., USA) (BRUCE *et al.*, 2002). IgG anti-OTA.1, produzida no líquido ascítico e sobrenadante de cultura em meio sintético, foram combinadas obtendo-se um *pool* de 6,0 L (87,31 µg/mL de proteína). O *pool* de IgG foi concentrado por ultrafiltração (sistema *Stirred Cell* 8400, Millipore Co., Bedford, MA, USA) em membrana de exclusão molecular de 100 Kda (YM 100, celulose, Millipore Co., Bedford, MA, USA), seguido de precipitação da fração IgG com sulfato de amônio (243 g/L de sobrenadante). O precipitado protéico foi ressuscendido em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 (55 mL) e dialisado (*cut-off* de 12000-16000 MM) contra tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 (4 x 1 L) a 4° C por 16 horas (HARLOW; LANE, 1988c; VANKOVÁ *et al.*, 1998). Após diálise, a concentração de IgG foi determinada a 280 nm (valor de absorbância de 1,35 para 1 mg/mL) e o grau de pureza analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970).

2.1.2 Oxidação de IgG anti-OTA

A oxidação de IgG foi desenvolvida conforme Vanková *et al.* (1998). A solução de IgG purificada (58 mL; 6,68 mg/mL) foi adicionada de 5,8 mL de m-periodato de sódio 0,1 M (Acros Organics, New Jersey, USA) (correspondente a 1/10 do volume original da amostra) e a mistura agitada por 30 min a 4° C no escuro. A reação foi paralisada

adicionando etilenoglicol (Acros Organics, New Jersey, USA) para concentração final de 20 mM, seguido de 10 min de agitação. A solução de IgG oxidada foi dialisada (*cut-off* 12000-16000 MM) a 4° C por 20 horas contra tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 (1 x 2 L), seguido de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 contendo NaCl 0,5 M (2 x 2 L). Após oxidação, a concentração de IgG oxidada e a atividade anti-OTA foram determinadas a 280 nm (valor de absorbância de 1,35 para 1 mg/mL) e i-ELISA, respectivamente.

2.1.3 Preparo de suporte sólido sílica-hidrazida

A ativação da sílica foi conduzida conforme descrito por RUHN *et al.* (1994). Um grama de sílica (*Polygoprep* 300-50, Machery-Nagel, USA) foi adicionado de 8,5 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e degaseificado em banho ultrasônico (*Ultrasonic cleaner* Unique) sob vácuo por 15 min. A suspensão foi adicionada de 0,20 mL de 3-glicidoxi-propil-trimetoxi silano (Sigma Aldrich Inc., Milwaukee, WI, USA) e agitada por 5 horas a 90° C. A sílica-epóxi formada foi lavada com água ultra-pura (*Ultra Pure Water System Milli-Q plus*, Millipore Corp., Bedford, MA, USA), seguido de solução de ácido sulfúrico pH 3,0 (3 x 10 mL, cada). Após lavagem, a sílica foi ressuspensa em solução de ácido sulfúrico pH 3,0 (100 mL/g de sílica) e submetida a refluxo por 90 min a 100° C. O produto sílica-diol foi lavado com água, metanol e éter (3 x 10 mL, cada) e seco a vácuo (25° C, 16 horas). Após secagem, 1 g de sílica-diol foi ressuspensa em 20 mL de solução de ácido acético a 90 % contendo 1 g de ácido periódico (Acros Organics, New Jersey, USA) e a mistura sonicada sob vácuo por 15 min, seguido de agitação por 2 horas a 25° C. O produto sílica-aldeído foi lavado com água deionizada (3 x 10 mL) e adicionado de 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 5,0 contendo dihidrazida adipica (25 mmol) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A mistura foi agitada por 1 hora, centrifugada (8000x g, 15 min) e lavada com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (3 x 10 mL). O produto sílica-hidrazida foi adicionado de 20 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8,0 contendo NaBH₄ (6 mmol) (Wako Pure Chemical Co., Tokyo, Japan) e agitado por 90 min. A sílica-Hz foi lavada com água deionizada (4 x 10 mL) e o suporte ativado mantido em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 a 4° C até o uso.

2.1.4 Imobilização de IgG oxidada à sílica-hidrazida

A reação de imobilização de IgG oxidada em sílica-Hz ativada foi conduzida essencialmente conforme Vanková *et al.* (1998). Volumes de 2, 3, 4 e 5 mL da solução de IgG oxidada (qsp, 5 mL em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 contendo NaCl 0,5 M), correspondente a 11,79; 17,68; 23,58 e 29,47 mg de IgG, respectivamente, foram combinados com 0,50 g de sílica-Hz seguido de reação a 4° C por 16 horas sob agitação lenta. Após a reação, os quatro imunossuportes de sílica-Hz-IgG (i.e. 4 concentrações de IgG imobilizada) foram acondicionados individualmente em seringa descartável de 3,0 mL (Figura 3). As colunas foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, seguido de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 contendo NaCl 2 M e água deionizada (3 x 5 mL, cada). As quatro CIA-Hz confeccionadas foram mantidas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 a 4° C até o uso.

2.2 Caracterização de CIA-Hz anti-OTA

2.2.1 Análise de eficiência de imobilização

Após a imobilização, a concentração de IgG não acoplada e eluída de cada CIA-Hz foi determinada no tampão de reação e soluções de lavagem por absorção a 280 nm (valor de absorbância de 1,35 para 1 mg/mL) (VANKOVÁ *et al.*, 1998). A quantidade de IgG imobilizada à sílica foi calculada por diferença entre a quantidade de IgG em solução antes e após a imobilização. A eficiência de acoplamento de cada CIA-Hz foi determinada por razão entre o total de IgG imobilizado (mg) e total adicionado (mg) e, expressa como porcentagem de imobilização.

2.2.2 Determinação de capacidade de retenção de OTA por CIA-Hz

A capacidade de retenção de OTA por cada CIA-Hz (ng OTA/g sílica) foi determinada conforme Watanabe *et al.* (2001). Volume de 5 mL de OTA (10 ng/mL) em PBS-bicarbonato de sódio a 1 % (1:1) foi aplicado em CIA-Hz sob fluxo de 1-2 gotas/seg. Duas frações (2,5 mL) foram coletadas de cada coluna e analisadas por CLAE. A coluna foi lavada com 10 mL de PBST (PBS + 0,01 % Tween 20), seguido de 10 mL de água ultra-pura (1-2 gotas/seg). A OTA ligada à CIA-Hz foi eluída com 1,5 mL de metanol (1-2 gotas/seg) e quantificada por CLAE.

2.2.3 Determinação de atividade específica de CIA-Hz

A atividade específica de cada CIA-Hz (ng OTA/mg IgG imobilizado) foi determinada, calculando a razão entre a capacidade de retenção de OTA (ng) e o total de IgG imobilizado à sílica-Hz (mg), conforme Vanková *et al.* (1998).

2.3 Validação intra-laboratorial de CIA-Hz anti-OTA

A CIA-Hz selecionada, i.e. com melhor perfil referente à imobilização de IgG, retenção de OTA e atividade específica conforme item 2.2, foi avaliada quanto à eficiência na limpeza, determinação e recuperação de OTA em diferentes matrizes alimentares, bem como submetida à comparação com CIA comercial OchraTest (Vicom Inc., Watertown, USA).

2.3.1 Amostras

As amostras utilizadas foram arroz, milho e café verde. Grãos de milho (Híbrido AG7000) e café verde (cultivar Sachimor Amarelo) foram colhidos na estação experimental do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR, Londrina-PR), safras 2005 e 2003, respectivamente, enquanto que arroz branco foi adquirido no comércio local.

As amostras (arroz, milho e café verde) negativas para OTA (< LOD 0,57; 0,72 e 0,75 µg/Kg por CLAE, respectivamente), foram artificialmente contaminadas com OTA (500 ng/mL em metanol), obtendo-se matrizes contendo 5 e 20 µg/Kg. Após repouso a 25° C por 24 horas, as amostras foram extraídas, submetidas à limpeza em CIA (OchraTest e CIA-Hz) e analisadas por CLAE. O estudo de recuperação consistiu de análise em duplicata.

2.3.2 Extração de OTA

A extração de OTA foi realizada conforme LEONI *et al.* (2001). Amostras de arroz, milho e café (100 g) foram trituradas para 48 mesh (moinho A10, Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Germany). A seguir, 15 gramas foram extraídos com 100 mL de solução de bicarbonato de sódio a 1 % sob agitação (175 rpm - 15 min) e filtração (filtro qualitativo nº 1, Whatman International Ltd., Maistone, England), obtendo-se o extrato bruto.

2.3.3 Limpeza de extrato bruto

A etapa de limpeza foi conduzida em CIA OchraTest e CIA-Hz, individualmente. O extrato bruto (40 mL) foi adicionado de 40 mL de PBST (PBS + 0,01 % Tween 20), filtrado (filtro de microfibras de vidro GF/C, Whatman International Ltd., Maistone, England) e 10 mL aplicados em CIA sob fluxo de 1-2 gotas/seg. A coluna foi lavada com 10 mL de PBST e 10 mL de água ultra-pura (1-2 gotas/seg). A OTA foi eluída com 1,5 mL de metanol (1-2 gotas/seg) e o eluato evaporado a 40° C sob fluxo de N₂ gasoso.

2.3.4 Determinação de OTA por CLAE

OTA foi analisada conforme Pittet *et al.* (1996). O resíduo foi dissolvido em acetonitrila-água (1:1, 1 mL) e 20 µL injetados no sistema de CLAE (isocrático de fase reversa) (bomba LC-10AT VP, detector de fluorescência RF-10AXL, Shimadzu, Japan) com coluna Nucleosil 100 C₁₈ (5 µm, 4 x 250 mm, Merck, Germany). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 475 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de acetonitrila-água-ácido acético (99:99:2) pH 3,0 sob fluxo de 0,8 mL/min. O limite de detecção para OTA foi calculado como sendo 3 vezes o ruído obtido de cada matriz alimentar (desvio padrão de 10 medidas do branco da amostra) (SOARES, 2006). A concentração de OTA foi determinada utilizando curva padrão confeccionada de 0,04 ng a 1,0 ng OTA, correspondente a solução contendo 2 a 50 ng/mL em acetonitrila-água (1:1).

2.3.5 Regeneração de CIA

As CIA (OchraTest e CIA-Hz) utilizadas foram regeneradas conforme Nakajima *et al.* (1990) e avaliadas quanto à reutilização. As colunas foram lavadas com 5 mL de tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 8,5 contendo NaCl 0,5 M, seguido de 5 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5 contendo NaCl 0,5 M e 5 mL de PBS. Após lavagem, as colunas foram mantidas a 4° C por 72 horas e reutilizadas sucessivamente por até 5 vezes, sendo o processo analisado em amostras de arroz, milho e café verde artificialmente contaminados. A reutilização de CIA para cada matriz alimentar foi avaliada por CLAE e expressa como porcentagem de recuperação de OTA após cada reuso.

2.3.6 Eficiência de CIA pós-uso

A eficiência do processo de regeneração foi determinada calculando a razão entre a concentração de OTA recuperada após cada uso de CIA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) e a capacidade original da coluna referente ao primeiro uso e, expressa como porcentagem.

2.3.7 Relação entre CIA-Hz e CIA OchraTest

A eficiência de CIA-Hz em relação à CIA comercial foi avaliada em cada utilização da coluna e mediante cada substrato, comparando as concentrações de OTA detectadas por ambas as técnicas de limpeza.

2.3.8 Análise estatística

A OTA recuperada de cada matriz alimentar, após limpeza em CIA OchraTest e CIA-Hz, foram analisadas pelo programa ANOVA/MANOVA (Statistica software versão 5.0, StatSoft Inc., USA) mediante teste de Tukey ($P < 0,05$).

3 Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento de imunossuporte sílica-hidrazida-IgG

A introdução de AcM na cromatografia de imunoafinidade superou o problema inerente de AcP, caracterizado por diversidade na especificidade e afinidade a antígeno. O AcM apresenta especificidade e afinidade uniforme aliado à baixa reatividade cruzada, conferindo eficiente limpeza de amostra e aplicabilidade na análise de micotoxinas em matrizes complexas (PFEIFFER *et al.*, 1987; SCOTT; TRUCKSESS, 1997).

O AcM IgG anti-OTA.1 caracteriza-se por especificidade à OTA e baixa reatividade cruzada perante os análogos 4R-OH-OTA (1,19 %), OTB (0,63 %) e OT α (0,06 %). A reatividade com OTC (63,10 %) pode ser considerada irrelevante devido à ocorrência natural incomum, além de apresentar menor toxicidade (KAWAMURA *et al.*, 1989).

A Tabela 1 apresenta a concentração protéica e atividade anti-OTA de IgG nas etapas de pré, pós-purificação e oxidação, com obtenção de 58 mL de IgG anti-OTA

contendo 6,68 mg/mL de anticorpo purificado, totalizando 387,23 mg destinados à imobilização em matriz sólida para confecção de imunossuporte específico.

A extensão da imobilização de IgG, i.e. quantidade e orientação de biomolécula acoplada ao suporte sólido, constitui fator decisivo na reatividade do imunossuporte, e é dependente do método de ativação da matriz e grupo reativo disponível no anticorpo para o acoplamento (PFEIFFER *et al.*, 1987; WIMALASENA; WILSON, 1991). A estratégia adotada para a imobilização do AcM anti-OTA envolveu ativação específica, para prosseguir com ligação direcionada do grupo aldeído (-CHO) da molécula de IgG ao grupo hidrazida (-NH-NH₂) do suporte sólido, (Figura 1).

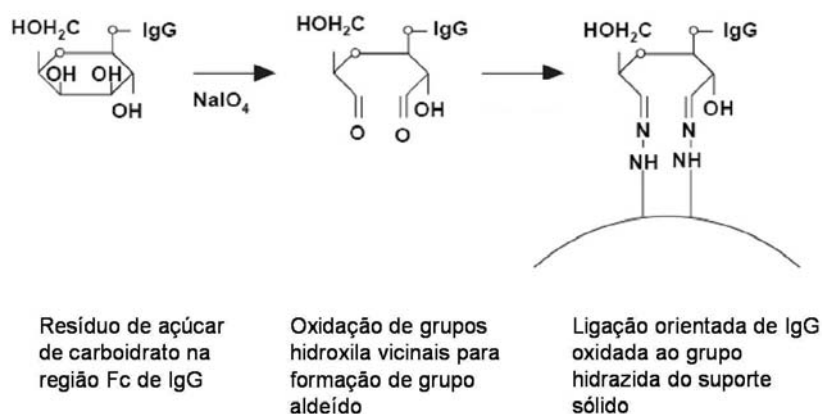


Figura 1 – Imobilização de IgG via molécula de carboidrato ao grupo funcional hidrazida (-NH-NH₂) presente na superfície do suporte sólido.

Fonte: (BIO-RAD LABORATORIES, USA)

A ativação de AcM consistiu na oxidação do resíduo de carboidrato no domínio Fc, originando grupo reativo aldeído capaz de interagir com o suporte sólido e favorecer a acessibilidade estérica do sítio Fab ao antígeno (Figura 1) (RUHN *et al.*, 1994; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001). A oxidação de AcM anti-OTA purificado resultou em 65 mL de IgG oxidada (5,89 mg/mL), correspondente a 73,14 % (383,17 mg) da quantidade inicial de IgG (523,86 mg) e manteve 67,05 % da atividade anti-OTA por i-ELISA (tabela 1). A redução na quantidade de IgG e atividade anti-OTA foi atribuída à perda do teor protéico, aliada à provável inativação de AcM no decorrer de tratamento, que envolveu etapas de manutenção, precipitação, agitação, centrifugação e oxidação.

A ativação da matriz inerte consistiu em modificação química superficial da sílica, envolvendo reação do grupo silanol com reagente organossilano e hidrólise ácida (etapa 1), oxidação (2) e incorporação de grupo hidrazida (3), capaz de reagir especificamente com o

grupo aldeído de IgG, obtendo ligação covalente hidrazona estável (4) (RUHN *et al.*, 1994; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001) (Figura 2).

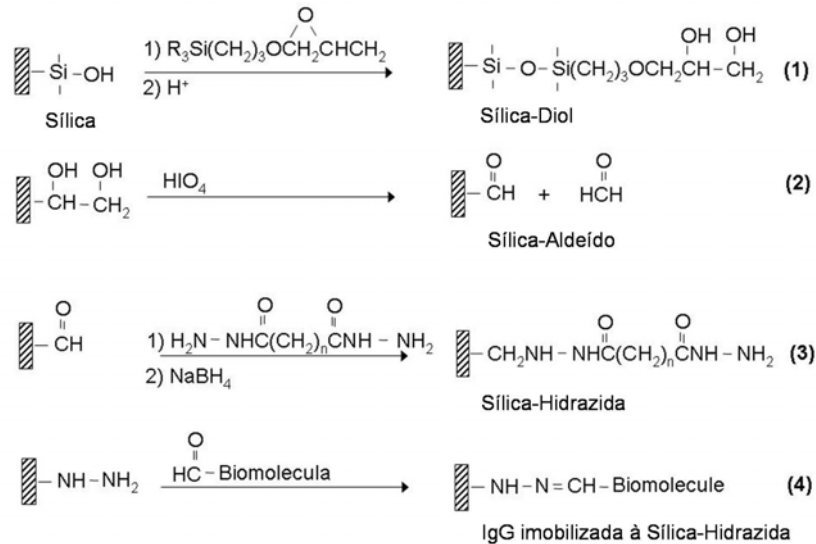


Figura 2 – Preparo do suporte sólido ativado sílica-hidrazida (etapas 1, 2, 3) e imobilização de biomolécula (etapa 4).

Fonte: (RUHN *et al.*, 1994)

Conforme Ruhn *et al.* (1994), a limitação no uso de reagente dihidrazida [$\text{H}_2\text{N}-\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{NH}_2$] para ativação de suporte consiste na possível interação de ambos os grupos hidrazida terminais ($-\text{NH}-\text{NH}_2$) à superfície da sílica. O ataque bifuncional pode ser controlado por excesso de reagente dihidrazida, associado à redução do grau de oxidação da sílica.

A escolha da sílica para compor a matriz sólida baseou-se na rigidez e estabilidade térmica e hidrolítica do material, além de permitir modificação superficial por adição de grupo funcional. O fato minimiza a adsorção inespecífica e favorece a acessibilidade a ligantes específicos (ex., IgG) (RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; TONHI *et al.*, 2002).

Sumarizando, a imobilização de IgG anti-OTA à sílica-hidrazida foi conduzida de forma direcionada, minimizando a possibilidade de orientação inadequada e fixação da biomolécula em pontos múltiplos na matriz, condições que afetam diretamente a atividade específica do imunossuporte. Assim, a concentração de IgG oxidada foi o fator determinante da imunoreatividade, capaz de influenciar a imobilização em sílica-Hz e a atividade específica anti-OTA (WIMALASENA; WILSON, 1991; VANKOVÁ *et al.*, 1998).

3.2 Caracterização de CIA-Hz

A Tabela 2 apresenta o efeito da densidade de IgG anti-OTA oxidada na eficiência de imobilização em sílica-Hz [i], assim como na retenção de OTA e atividade específica de CIA-Hz confeccionada [ii], conforme abaixo descrito:

[i] – Eficiência de imobilização em sílica-Hz

O aumento da concentração de IgG de 2,36 a 5,89 mg/mL reduziu a capacidade de acoplamento de 69,68 para 37,53 %, indicando uma correlação negativa (tabela 2). Wimalasena e Wilson (1991) obtiveram o mesmo perfil acoplando fragmento Fab de IgG em gel ativado com grupo iodoacetil, com aumento na eficiência de imobilização de 50 para 67 % diminuindo a quantidade de IgG de 5,0 para 0,94 mg.

O aumento na densidade de IgG durante o acoplamento poderia ocasionar bloqueio estérico do grupo hidrazida na superfície da sílica devido a formação de camada de anticorpo (*crowding*), minimizando o acesso do grupo reativo livre à biomolécula (WIMALASENA; WILSON, 1991). Aliado a este fator, a quantidade de IgG adicionada poderia exceder o número de grupo hidrazida disponível na sílica, causando efeito de saturação (PFEIFFER *et al.*, 1987; WIMALASENA; WILSON, 1991). RUHN *et al.* (1994) atingiram eficiência de 76,43 % utilizando processo similar de imobilização com densidade de 66,24 mg de IgG acoplado/g de sílica, indicando alto conteúdo de grupo hidrazida exposto na superfície da sílica (51,80 $\mu\text{mol/g}$ sílica).

Embora tenha ocorrido redução na imobilização, a adição de 11,79 a 23,58 mg de IgG oxidada à sílica-Hz (ensaios 1, 2 e 3) resultou em aumento no Ac imobilizado disponível para OTA. Não se recomenda o uso de maior conteúdo de IgG para o desenvolvimento do imunossuporte, devido ao menor potencial de acoplamento (37,53 %) e perda de 18,41 mg de Ac não imobilizado (ensaio 4, Tabela 2).

Ruhn *et al.* (1994), avaliando a interação de biomoléculas não oxidadas à sílica-Hz, constataram baixa adsorção, indicando imobilização conduzida essencialmente pela ligação específica de IgG oxidado via resíduo de carboidrato, ao grupo Hz reativo da matriz.

[ii] – Eficiência na retenção de OTA e atividade específica de CIA-Hz

A imobilização orientada de Ac favorece a obtenção de imunossuporte com alta capacidade de retenção de antígeno e atividade específica (HOFFMAN; O'SHANNESY, 1988; WIMALASENA; WILSON, 1991). Vanková *et al.* (1988), comparando o desempenho de imunossuporte oriundo de acoplamento orientado e aleatório, evidenciaram maior atividade específica de Affi-Gel Hz (0,68 μg citocinas/mg IgG) em

relação a Affi-Gel 10 (0,24 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Todavia, deve-se considerar também o efeito da concentração de IgG imobilizada na acessibilidade estérica do sítio de ligação ao antígeno (domínio Fab). Wimalasena e Wilson (1991), procedendo à imobilização orientada via hidrazida, apontaram potencial específico do imunossuporte (0,23 e 0,47 mg Ag/mg Ac) dependente da densidade de IgG utilizada (3,97 e 0,75 mg/mL gel, respectivamente). A alta concentração de IgG imobilizada poderia ocasionar impedimento estérico do sítio Fab da biomolécula, reduzindo a capacidade específica da CIA.

Conforme Tabela 2, o aumento na quantidade de IgG anti-OTA imobilizada (8,22 a 11,57 mg) não afetou a atividade específica da CIA-Hz, obtendo-se valores similares de 0,96 a 0,98 ng OTA/mg IgG acoplado. Os resultados indicaram que a alta densidade de IgG imobilizada não limitou o acesso estérico à OTA provavelmente devido a baixa massa molecular (403,82 Da). Conforme Vanková *et al.* (1998), a quantidade de IgG na superfície da matriz (7,2 e 4,3 mg IgG/mL gel) não afetou o potencial específico anti-citocina do imunossuporte celulose-Hz empregando 0,54 e 0,50 μg citocina/mg IgG, respectivamente.

A massa molecular do antígeno pode influenciar a capacidade específica do imunossuporte, ocasionando bloqueio estérico do domínio Fab do anticorpo (WIMALASENA; WILSON, 1991). Sendo a OTA uma molécula de 403,82 Da, o impedimento estérico pela densidade de IgG ou tamanho do antígeno provavelmente não constituiu problema relevante na atividade específica da CIA (PFEIFFER *et al.*, 1987; WIMALASENA; WILSON, 1991). Baseado nisso, a baixa quantidade de OTA retida (em nível de ng) por mg de IgG acoplado nas quatro CIA-Hz (0,96 a 0,98 ng/mg) provavelmente decorreu da inativação do Ac imobilizado, i.e. perda gradativa da atividade anti-OTA nas etapas de precipitação à oxidação (tabela 1).

Além disso, a ausência de capeamento do imunossuporte sílica-Hz-IgG com agente bloqueador (ex., albumina de soro bovino, gliceraldeído) pode ter contribuído para a baixa eficiência da coluna, expondo a OTA a sítios inespecíficos residuais na sílica (ex., grupo silanol, diol, hidrazida) (TONHI *et al.*, 2002; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB, 1999). A ligação não seletiva de OTA na sílica reduziria a eficiência da coluna baseada em separação por bioafinidade (IgG), provocando retenção adicional do antígeno por adsorção e conseqüente subestimação da quantidade de OTA eluída (TONHI *et al.*, 2002; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB, 1999). Soma-se ainda o efeito da dimensão (diâmetro) da coluna na capacidade de CIA-Hz. Coluna de maior comprimento permitiria maior contato para a reação Ac-Ag e favoreceria a separação cromatográfica, melhorando a capacidade de CIA-Hz.

Apesar da similaridade nos valores de potencial específico, os resultados indicaram maior retenção de OTA pelo ensaio 3, com 11,24 ng de OTA ligada a 11,57 mg de IgG imobilizado, sendo esta CIA-Hz selecionada para prosseguir com o estudo de validação (Tabela 2).

3.3 Validação intralaboratorial de CIA-Hz

O desempenho de CIA-Hz foi comparado à CIA comercial OchraTest quanto à eficiência no processo de limpeza e recuperação de OTA de distintas matrizes alimentares.

A seleção de matrizes alimentares (arroz, milho e café) foi baseada na contaminação natural comprovada por OTA, associada à representatividade na produção e consumo no mercado interno e âmbito internacional (KPODO *et al.*, 1996; NUNES *et al.*, 2003; PARDO *et al.*, 2004; GONZÁLEZ *et al.*, 2006; ZINEDINE *et al.*, 2006).

A Figura 4 apresenta o perfil cromatográfico de arroz, milho e café submetidos à limpeza em CIA OchraTest e CIA-Hz e analisados por CLAE. Considerando o LOD para arroz (0,57 µg/Kg), milho (0,72 µg/Kg) e café verde (0,75 µg/Kg), as matrizes empregadas demonstraram ausência de contaminação natural por OTA e poucos interferentes alimentares (Figura 4, B, C, D). Procedendo à contaminação artificial destes substratos, ambas as colunas resultaram em cromatogramas livres de picos interferentes (componentes co-extraídos) próximos ao tempo de retenção de OTA ($t_r = 10,8$ min), com pico de OTA nitidamente definido (Figura 4, E, F, G, H, I, J). Os picos adicionais com t_r distintos a OTA provavelmente seja interação inespecífica de componentes alimentares inerentes da matriz alimentar à sílica-Hz ou à molécula de IgG, concomitantemente eluídos com OTA.

A Tabela 3 apresenta a recuperação de OTA de arroz, milho e café artificialmente contaminados (5 e 20 µg/Kg), após limpeza em CIA (OchraTest e CIA-Hz), seguido de análise por CLAE.

As CIA diferiram significativamente quanto à recuperação de OTA para os três substratos analisados ($P < 0,05$). A limpeza em CIA OchraTest apresentou recuperação variando de 71,51 a 86,81 % (média, 79,16 %) para arroz; 89,37-93,07 % (média, 91,22 %) para milho e 62,08-71,95 % (média, 67,02 %) para café. A recuperação por CIA-Hz atingiu valores médios de 62,87 % (faixa de 56,02-69,72 %), 71,33 % (69,85-72,80 %) e 54,58 % (49,74-59,42 %) para as mesmas matrizes, respectivamente. Os baixos valores de coeficiente

de variação de 0,39 a 2,25 % para CIA OchraTest e 1,09 a 2,09 % para CIA-Hz garantiram a repetibilidade e confiabilidade dos ensaios.

Os resultados demonstraram um melhor desempenho da coluna comercial, sendo a eficiência de CIA-Hz de 78,23-81,31 % em relação à CIA OchraTest (Tabela 3). A menor recuperação por CIA-Hz foi provavelmente ocasionada pelo efeito adicional de adsorção no mecanismo de separação da coluna (bioafinidade), devido à ausência de capeamento (TONHI *et al.*, 2002; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB, 1999). O fato direciona o efeito de matriz alimentar na competição pelo sítio ativo da CIA-Hz (IgG e grupo inespecífico na sílica), reduzindo OTA disponível para Ac específico imobilizado. Assim, a eficiência de CIA-Hz seria melhorada usando bloqueador, capaz de anular os sítios ativos inespecíficos expostos na sílica.

Em relação às matrizes, o arroz e milho não apresentaram diferença significativa mediante teste de Tukey ($P > 0,05$), embora os resultados apontaram maior recuperação de OTA em milho (69,85-93,07 %). Em café verde, a baixa recuperação (49,74-71,95 %) pode ser decorrente da complexidade química da matriz, caracterizada por excesso de pigmentação natural, cafeína e compostos fenólicos (ácido clorogênico) (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Estes componentes afetariam a reação imunológica na CIA por bloqueio estérico ou interação inespecífica com o anticorpo, resultando em menor retenção e recuperação de OTA (HEFLE, 1995; BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996).

SUGITA-KONISHI *et al.* (2006) compararam o desempenho de coluna de imunoafinidade e multifuncional (*Multisep* 229, Romer Labs Inc., USA) na detecção de OTA em trigo, milho e café verde artificialmente contaminados (0,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). A recuperação média de OTA por CIA variou de 59,0 a 85,8 % e de 80,8 a 185,0 % para coluna multifuncional, com ênfase na baixa eficiência da análise de café verde por ambas as colunas. Scudamore E Macdonald (1998) constataram ausência de diferença significativa entre as CIA OchraTest (91,0 %) e OchraPrep (93,0 %) na recuperação de OTA em trigo contaminado com 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Todavia, Furlani *et al.* (1999) revelaram diferenciação no desempenho entre duas marcas de CIA (A e B) na análise de café verde com 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de OTA, atingindo recuperação de 97,3 e 73,0 %, respectivamente.

Referente ao nível de contaminação da matriz (5 e 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), as recuperações não diferiram significativamente, apresentando valores médios de 75,63 % (faixa de 59,42 a 93,07 %) e 66,43 % (49,74-89,37 %), respectivamente (Tabela 3).

As desvantagens referentes ao alto custo de CIA comercial e alta quantidade de IgG requerida para a confecção de CIA-Hz, aliadas às etapas laboriosas na ativação do suporte sólido, tendem a ser minimizadas aplicando um processo de regeneração da coluna, capaz de permitir reutilização sem perda significativa na atividade.

A Tabela 4 mostra a recuperação de OTA de arroz, milho e café artificialmente contaminados durante os sucessivos usos de CIA OchraTest e CIA-Hz, seguido de análise da eficiência das colunas e relação existente pós-uso sucessivo (Tabela 5).

A CIA OchraTest apresentou recuperação aceitável por 5 usos consecutivos (após 4 regenerações) na análise de arroz e milho, com manutenção média de 94,82 % (94,47-95,17 %) e 92,95 % (92,56-93,33 %) da capacidade original da coluna, respectivamente (tabela 5), demonstrando eficácia de regeneração e conservação da atividade biológica de IgG pós-uso. Em café, a recuperação média de OTA reduziu significativamente de 67,02 % (62,08-71,95 %) para 13,87 % (11,62-16,11 %) após 5 utilizações em CIA OchraTest (Tabela 4), com queda de eficiência já no segundo uso (57,25-58,61 %) em relação à capacidade original (Tabela 5). Nesta matriz, a composição complexa contribuiu para o baixo desempenho na reutilização, enfatizando o emprego único da coluna.

Referente à CIA-Hz, a utilização sucessiva da coluna reduziu gradativamente a recuperação de OTA nas três matrizes (Tabela 4). Os baixos valores atingidos na segunda utilização da coluna, sendo de 48,10 a 57,65 % para arroz; 58,42-63,82 % (milho) e 26,66-31,88 % (café), recomendaram o uso restrito à aplicação única de CIA-Hz (tabela 4). Após 5 usos, os níveis de OTA recuperada variaram de 8,80 a 49,73 % da quantidade real adicionada (5 e 20 µg/Kg, tabela 4), com retenção de 17,69 a 68,41 % da eficiência original da coluna (tabela 5), confirmando a ineficiência de CIA-Hz reutilizada. A diminuição gradual na recuperação de OTA e na eficiência da coluna pós-uso pode ser atribuída à ausência de capeamento, inativação do AcM pelo solvente de eluição (metanol), aliado à perda de IgG imobilizado durante a regeneração da coluna (KONDO *et al.*, 2002), reforçando novamente o uso de agente bloqueador (ex., BSA) para proteger IgG contra a desnaturação pelo metanol.

Kondo *et al.* (2002) desenvolveram CIA reutilizável baseada em suporte *Formyl-Cellulofine* ativado para análise de microcistina em água. A aplicabilidade da coluna foi mantida por 3 usos consecutivos com recuperação de 83-88 % após simples regeneração em tampão TRIS-HCl com BSA. Watanabe *et al.* (2001) confeccionaram CIA anti-imazalil, baseada em suporte *Sepharose-4B* ativado, que manteve 60,5 % da capacidade original após 30 usos sucessivos na análise de frutas cítricas. O processo de regeneração desenvolvido por

NAKAJIMA *et al.* (1990) permitiu a reutilização de CIA anti-OTA (*Sepharose-4B* ativado) de até 30 vezes na análise de café, sem perda significativa na atividade do anticorpo.

Comparando a recuperação de OTA, a eficiência de CIA-Hz em relação à CIA OchraTest foi de 78,23 a 81,31 % no primeiro uso, 67,41-75,16 % (segundo uso), 48,82-58,40 % (terceiro uso), 40,10-61,09 % (quarto uso) e 39,15-73,33 % (quinto uso), dependendo da matriz.

Em comparação à CIA comercial (ex., OchraTest, R\$ 28,40/coluna) e imunossuporte confeccionado com fase sólida ativada (ex., Affi-Gel 10, R\$ 67,87/coluna), o desenvolvimento de uma coluna de sílica (CIA-Hz, R\$ 85,95/coluna) teoricamente aumentou o custo em 3,03 e 1,27 vezes, respectivamente. Outrossim, o custo obtido na confecção preliminar de CIA-Hz pode ser aceitável, considerando que a inovação tecnológica seja altamente dispendiosa. Assim sendo, supõe-se que o custo para confecção de CIA-Hz pode ser reduzido após sucessiva padronização e otimização, atingindo condição mínima requerida para executar ensaio de rotina laboratorial.

4 Conclusão

Sendo assim, embora a CIA-Hz confeccionada tenha apresentado menor desempenho em relação à coluna comercial, a eficiência na limpeza da amostra e recuperação atingida com o primeiro uso comprovou sua aplicabilidade na análise de OTA, devendo-se prosseguir com estudo inserindo novas condições e ensaios de padronização. Em adição, a disponibilidade de AcM específico, limpeza de extrato alimentar em única etapa cromatográfica (rapidez), uso reduzido de solventes tóxicos e possibilidade de reutilização, justificam o desenvolvimento de CIA visando minimizar o custo referente à sua aquisição e aplicação no controle de qualidade.



Figura 3 – Coluna de imunoafinidade baseada em imunossuporte sílica-hidrazida-IgG empregando AcM IgG anti-OTA.1.

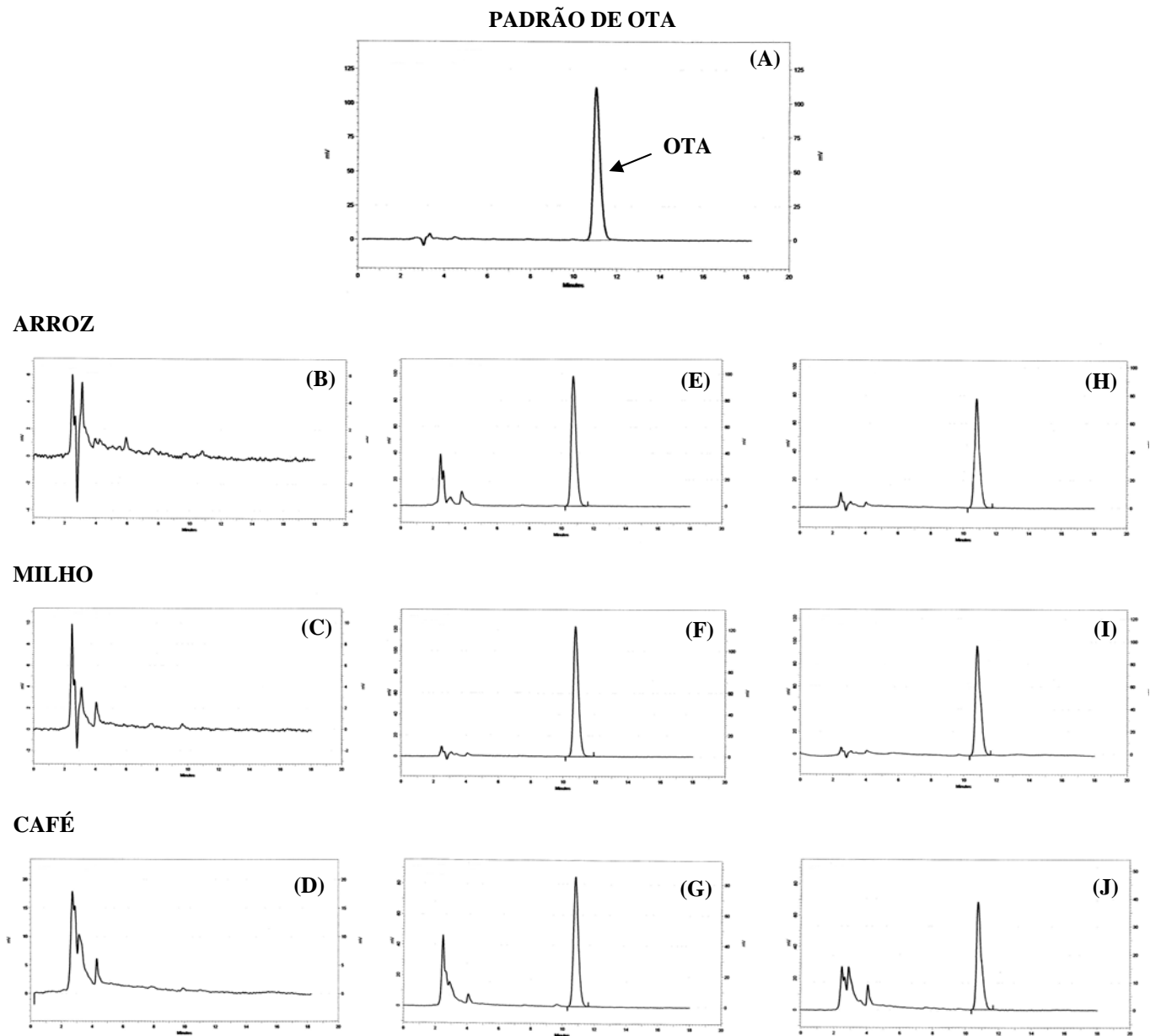


Figura 4 – Perfil cromatográfico de arroz, milho e café verde submetidos à limpeza em CIA e analisados por CLAE (condições: sensibilidade alta, ganho 1x, resposta 3). (A) Padrão de OTA, 25 ng/mL. Controle negativo de substrato pós-limpeza em CIA OchraTest, arroz (B), milho (C) e café (D). Substratos artificialmente contaminados com 20 µg/Kg de OTA pós-CIA OchraTest, arroz (E), milho (F) e café (G). Substratos artificialmente contaminados com 20 µg/Kg de OTA pós-CIA-Hz, arroz (H), milho (I) e café (J).

Tabela 1 – Concentração protéica e atividade anti-OTA de IgG nas etapas de pré, pós-purificação e oxidação, para conjugação ao suporte ativado sílica-hidrazida

Amostra	Volume amostra (mL)	Proteína (IgG)			Atividade anti-OTA (%) ^d
		Concentração (mg/mL)	Total (mg)	Recuperação (%) ^c	
IgG total ^a	6000	0,087	523,86	100,00	100
IgG purificada ^b	58	6,676	387,23	73,92	80,82
IgG oxidada	65	5,895	383,17	73,14	67,05

^a Total de proteína obtida de sobrenadante de cultivo (78,13 µg/mL, 5980 mL) e líquido ascítico de camundongo (2,58 mg/mL, 20 mL); ^b Purificação de IgG por precipitação com sulfato de amônio (243g/L); ^c Total de IgG em cada tratamento em relação ao total de proteína inicial (523,86 mg); ^d Absorção a 450 nm de IgG anti-OTA em cada tratamento em relação à absorção de IgG inicial, determinada por i-ELISA.

Tabela 2 – Efeito da densidade de IgG anti-OTA oxidada na eficiência de imobilização em sílica-hidrazida, capacidade de retenção de OTA e atividade específica de CIA-Hz

Ensaio	IgG adicionada			Sílica-Hz (g)	IgG imobilizada		Imobilização (%) ^a	CIA-Hz	
	Densidade (mg/mL)	Volume (mL)	Total (mg)		Total (mg)	Densidade (mg/g sílica-Hz)		Retenção de OTA (ng) ^b	Atividade específica (ng OTA/mg IgG) ^c
1	2,36	5,0	11,79	0,50	8,22	16,43	69,68	8,06	0,98
2	3,54	5,0	17,68	0,50	9,89	19,79	55,94	9,62	0,97
3	4,72	5,0	23,58	0,50	11,57	23,15	49,07	11,24	0,97
4	5,89	5,0	29,47	0,50	11,06	22,12	37,53	10,67	0,96

^a Total de IgG oxidada imobilizada (mg) em relação ao total adicionado (mg); ^b Total de OTA retida por CIA-Hz e quantificada por CLAE (OTA adicionada = 50 ng); ^c Total de OTA retida (ng) em relação ao total de IgG imobilizada à sílica-Hz (mg).

Tabela 3 – Recuperação de OTA de arroz, milho e café verde artificialmente contaminados, após limpeza em CIA OchraTest e CIA-Hz, seguido de análise por CLAE

Matriz	OTA adicionada (ng/g) ^b	CIA OchraTest ^a			CIA-Hz ^a			Relação CIA-Hz/CIA OchraTest (%) ^e
		OTA recuperada (ng/g)	Recuperação (%)	CV (%) ^c	OTA recuperada (ng/g)	Recuperação (%)	CV (%)	
Arroz	5	4,34 ± 0,05	86,81 ± 0,93 abA ^d	1,08	3,49 ± 0,05	69,72 ± 1,03 abB	1,48	79,37
	20	14,30 ± 0,06	71,51 ± 0,28 abA	0,39	11,20 ± 0,12	56,02 ± 0,61 abB	1,09	
Milho	5	4,65 ± 0,08	93,07 ± 1,59 aC	1,71	3,64 ± 0,07	72,80 ± 1,49 aD	2,05	78,23
	20	17,87 ± 0,11	89,37 ± 0,54 aC	0,60	13,97 ± 0,21	69,85 ± 1,04 aD	1,49	
Café	5	3,60 ± 0,08	71,95 ± 1,62 bE	2,25	2,97 ± 0,06	59,42 ± 1,24 bF	2,09	81,31
	20	12,42 ± 0,10	62,08 ± 0,52 bE	0,84	9,95 ± 0,11	49,74 ± 0,55 bF	1,10	

^a Média ± desvio padrão de duas replicatas; ^b Padrão de OTA adicionado em arroz, milho e café previamente analisados por CLAE (< 0,57; 0,72 e 0,75 ng/g); ^c Coeficiente de variação; ^d Letras minúsculas iguais na mesma coluna (análise entre substratos) e letras maiúsculas iguais na mesma linha (análise entre CIA) não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05); ^e Eficiência da CIA-Hz (ng/g) em relação à CIA OchraTest (ng/g), para cada substrato.

Tabela 4 – Recuperação de OTA de arroz, milho e café verde artificialmente contaminados, durante os sucessivos usos de CIA OchraTest e CIA-Hz, seguido de análise por CLAE

Matriz	OTA adicionada (ng/g) ^b	CIA OchraTest ^a				CIA-Hz ^a			
		Uso ^c	OTA recuperada (ng/g)	Recuperação (%)	CV (%) ^d	Uso ^c	OTA recuperada (ng/g)	Recuperação (%)	CV (%) ^d
Arroz	5	1	4,34 ± 0,05	86,81 ± 0,93 a ^e	1,08	1	3,49 ± 0,05	69,72 ± 1,03 a	1,48
		2	4,21 ± 0,07	84,11 ± 1,30 a	1,55	2	2,88 ± 0,05	57,65 ± 1,01 b	1,75
		3	4,16 ± 0,06	83,29 ± 1,20 a	1,44	3	1,95 ± 0,06	39,04 ± 1,29 c	3,30
		4	4,16 ± 0,06	83,10 ± 1,22 a	1,46	4	1,53 ± 0,04	30,54 ± 0,77 c	2,52
		5	4,10 ± 0,10	82,02 ± 2,06 a	2,51	5	1,46 ± 0,05	29,21 ± 0,91 c	3,10
	20	1	14,30 ± 0,06	71,51 ± 0,28 a	0,39	1	11,20 ± 0,12	56,02 ± 0,61 a	1,09
		2	13,86 ± 0,07	69,32 ± 0,37 a	0,54	2	9,62 ± 0,27	48,10 ± 1,35 b	2,80
		3	13,74 ± 0,06	68,68 ± 0,28 a	0,41	3	6,70 ± 0,06	33,49 ± 0,29 c	0,88
		4	13,89 ± 0,10	69,45 ± 0,48 a	0,69	4	6,03 ± 0,07	30,16 ± 0,33 c	1,08
		5	13,61 ± 0,06	68,04 ± 0,28 a	0,42	5	5,81 ± 0,07	29,05 ± 0,36 c	1,24
Milho	5	1	4,65 ± 0,08	93,07 ± 1,59 b	1,71	1	3,64 ± 0,07	72,80 ± 1,49 a	2,05
		2	4,62 ± 0,09	92,40 ± 1,78 b	1,92	2	3,19 ± 0,05	63,82 ± 0,91 b	1,43
		3	4,56 ± 0,08	91,19 ± 1,69 bc	1,86	3	2,84 ± 0,05	56,72 ± 0,98 bc	1,74
		4	4,49 ± 0,09	89,82 ± 1,90 bc	2,11	4	2,53 ± 0,04	50,55 ± 0,85 c	1,68
		5	4,34 ± 0,09	86,76 ± 1,81 c	2,09	5	2,49 ± 0,05	49,73 ± 1,06 c	2,14
	20	1	17,87 ± 0,11	89,37 ± 0,54 b	0,60	1	13,97 ± 0,21	69,85 ± 1,04 a	1,49
		2	17,76 ± 0,12	88,81 ± 0,60 b	0,68	2	11,68 ± 0,10	58,42 ± 0,50 b	0,85
		3	17,52 ± 0,11	87,58 ± 0,53 bc	0,60	3	9,55 ± 0,10	47,74 ± 0,50 bc	1,04
		4	17,25 ± 0,13	86,27 ± 0,64 bc	0,74	4	8,26 ± 0,11	41,30 ± 0,56 c	1,36
		5	16,54 ± 0,26	82,70 ± 1,29 c	1,56	5	8,01 ± 0,19	40,07 ± 0,95 c	2,38
Café	5	1	3,60 ± 0,08	71,95 ± 1,62 d	2,25	1	2,97 ± 0,06	59,42 ± 1,24 a	2,09
		2	2,11 ± 0,11	42,15 ± 2,27 e	5,39	2	1,59 ± 0,07	31,88 ± 1,33 b	4,17
		3	1,56 ± 0,09	31,26 ± 1,70 f	5,45	3	0,88 ± 0,05	17,58 ± 1,06 c	6,03
		4	1,03 ± 0,09	20,67 ± 1,84 g	8,89	4	0,60 ± 0,03	12,03 ± 0,66 c	5,52
		5	0,81 ± 0,08	16,11 ± 1,51 g	9,40	5	0,58 ± 0,04	11,66 ± 0,74 c	6,36
	20	1	12,42 ± 0,10	62,08 ± 0,52 d	0,84	1	9,95 ± 0,11	49,74 ± 0,55 a	1,10
		2	7,11 ± 0,09	35,53 ± 0,46 e	1,29	2	5,33 ± 0,05	26,66 ± 0,27 b	1,03
		3	5,07 ± 0,08	25,35 ± 0,38 f	1,50	3	2,81 ± 0,04	14,06 ± 0,22 c	1,60
		4	3,16 ± 0,09	15,79 ± 0,45 g	2,82	4	2,02 ± 0,04	10,10 ± 0,20 c	1,95
		5	2,32 ± 0,04	11,62 ± 0,22 g	1,93	5	1,76 ± 0,05	8,80 ± 0,24 c	2,68

^aMédia ± desvio padrão de duas replicatas; ^b Padrão de OTA adicionado em arroz, milho e café previamente analisados por CLAE (< 0,57; 0,72 e 0,75 ng/g); ^c Reutilização de CIA após processo de regeneração; ^d Coeficiente de variação; ^e Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05) e correspondem à análise entre os usos para cada substrato, independente do nível de contaminação.

Tabela 5 – Comparação entre CIA OchraTest e CIA-Hz na análise de OTA em arroz, milho e café verde artificialmente contaminados e, eficiência das colunas após cada uso consecutivo

Matriz	OTA adicionada (ng/g) ^b	Uso ^c	CIA OchraTest ^a		CIA-Hz ^a		Relação CIA-Hz/CIA OchraTest (%) ^e
			OTA recuperada (ng/g)	Eficiência pós-uso (%) ^d	OTA recuperada (ng/g)	Eficiência pós-uso (%)	
Arroz	5	1	4,34 ± 0,05	100,00	3,49 ± 0,05	100,00	79,37
		2	4,21 ± 0,07	97,00	2,88 ± 0,05	82,52	68,91
		3	4,16 ± 0,06	95,85	1,95 ± 0,06	55,87	47,82
		4	4,16 ± 0,06	95,85	1,53 ± 0,04	43,84	40,10
		5	4,10 ± 0,10	94,47	1,46 ± 0,05	41,83	39,15
	20	1	14,30 ± 0,06	100,00	11,20 ± 0,12	100	
		2	13,86 ± 0,07	96,92	9,62 ± 0,27	85,89	
		3	13,74 ± 0,06	96,08	6,70 ± 0,06	59,82	
		4	13,89 ± 0,10	97,13	6,03 ± 0,07	53,84	
		5	13,61 ± 0,06	95,17	5,81 ± 0,07	51,88	
Milho	5	1	4,65 ± 0,08	100,00	3,64 ± 0,07	100,00	78,23
		2	4,62 ± 0,09	99,35	3,19 ± 0,05	87,64	67,41
		3	4,56 ± 0,08	98,06	2,84 ± 0,05	78,02	58,40
		4	4,49 ± 0,09	96,56	2,53 ± 0,04	69,51	56,35
		5	4,34 ± 0,09	93,33	2,49 ± 0,05	68,41	52,12
	20	1	17,87 ± 0,11	100,00	13,97 ± 0,21	100,00	
		2	17,76 ± 0,12	99,38	11,68 ± 0,10	83,61	
		3	17,52 ± 0,11	98,04	9,55 ± 0,10	68,36	
		4	17,25 ± 0,13	96,53	8,26 ± 0,11	59,13	
		5	16,54 ± 0,26	92,56	8,01 ± 0,19	57,34	
Café	5	1	3,60 ± 0,08	100,00	2,97 ± 0,06	100,00	81,31
		2	2,11 ± 0,11	58,61	1,59 ± 0,07	53,54	75,16
		3	1,56 ± 0,09	43,33	0,88 ± 0,05	29,63	55,92
		4	1,03 ± 0,09	28,61	0,60 ± 0,03	20,20	61,09
		5	0,81 ± 0,08	22,50	0,58 ± 0,04	19,53	73,73
	20	1	12,42 ± 0,10	100,00	9,95 ± 0,11	100,00	
		2	7,11 ± 0,09	57,25	5,33 ± 0,05	53,57	
		3	5,07 ± 0,08	40,82	2,81 ± 0,04	28,24	
		4	3,16 ± 0,09	25,44	2,02 ± 0,04	20,30	
		5	2,32 ± 0,04	18,68	1,76 ± 0,05	17,69	

^a Média ± desvio padrão de duas replicatas; ^b OTA adicionada em arroz, milho e café previamente analisados por CLAE (< 0,57; 0,72 e 0,75 ng/g); ^c Reutilização de CIA após processo de regeneração; ^d Capacidade de CIA pós-uso (ng/g) em relação à capacidade original (uso 1); ^e Eficiência da CIA-Hz em relação à CIA OchraTest para cada uso.

6 CONCLUSÕES

- O ic-ELISA desenvolvido com AcM anti-OTA.7 foi aplicável na análise de OTA em café verde, atingindo confiabilidade e eficiência equivalentes à CLAE ($r = 0,98$).
- O emprego de IgG anti-OTA.7 proporcionou sensibilidade e especificidade adequadas ao ensaio, permitindo aplicação direta em análise de OTA em extrato bruto de café.
- A simplicidade, pouca ou nenhuma necessidade de limpeza e concentração de analito, uso reduzido de solventes tóxicos e o potencial de utilização em campo apontaram o imunoenensaio desenvolvido como alternativa promissora no controle de OTA em grãos de café.
- O AcM IgG anti-OTA produzido e purificado, empregando a linhagem de hibridoma anti-OTA.1, foi aplicado para desenvolver ensaios imunquímicos (ELISA e CIA) na detecção de OTA.
- O desenvolvimento tecnológico atingiu com sucesso a obtenção de imunorreagente, sem perda significativa na atividade biológica.
- Embora a CIA-Hz tenha apresentado menor desempenho nas análises em relação à coluna comercial OchraTest, a eficiência na limpeza da amostra e recuperação atingida com o primeiro uso comprovaram a aplicabilidade na análise de OTA, devendo-se ainda prosseguir com estudo inserindo novas condições e ensaios de padronização.
- A disponibilidade de AcM específico, limpeza de extrato alimentar em única etapa cromatográfica (rapidez), uso reduzido de solventes tóxicos e possibilidade de reutilização, justificam o desenvolvimento de CIA nacional, contribuindo para minimizar o custo referente à sua aquisição e aplicação no controle de qualidade.

7 PUBLICAÇÕES E TRABALHOS CIENTÍFICOS

Os resultados obtidos no transcurso da pesquisa foram publicados na forma de artigo científico, revisão, capítulo de livro, assim como apresentados em eventos científicos, listados abaixo:

- FUJII S., RIBEIRO R.M.R., SCHOLZ M.B.DOS S., ONO E.Y.S., PRETE C.E.C., ITANO E.N., UENO Y., KAWAMURA O., HIROOKA E.Y. Reliable indirect competitive ELISA for ochratoxin A survey in green coffee from the North of Paraná State, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 9, p. 902-909, sept/2006.
- S. FUJII, E.Y.S. ONO, M.H.P. FUNGARO, E.N. ITANO, T.C.R.M. DE OLIVEIRA, C.E.C. PRETE, M.H. TANIWAKI, O. KAWAMURA, Y. UENO, E.Y. HIROOKA. Indirect competitive ELISA for ochratoxin A detection in coffee and molecular identification of ochratoxin A producing *Aspergillus* strains. In: Njapau H., Trujillo S., van Egmond H.P., Park D.L. **Mycotoxins and Phycotoxins, Advances in determination, toxicology and exposure management**. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 61-71.
- FUJII S., ONO E.Y.S., RIBEIRO R.M.R., ASSUNÇÃO F.G.A., TAKABAYASHI C.R., OLIVEIRA T.C.R.M.DE, ITANO E.N., UENO Y., KAWAMURA O., HIROOKA E.Y. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2005. *In Press, Corrected Proof*.
- ONO E.Y.S., BIAZON L., FUJII S., ONO M. A., HIROOKA E. Y. Advances in immunochemical methods for mycotoxin/mycotoxigenic fungi detection in the agri-food system. In: Ganguli B.N., Deshmukh S.K. **Fungi: Multifaceted Microbes**. New Delhi: Anamaya Publishers, 2005. p. 275-293.
- FUJII S., GARCIA L.B., HIROOKA E.Y. Metodologia analítica imunológica 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.; RIBEIRO, R.M.R.; RIBEIRO, A.B.; TAKABAYASHI, C.R.; ONO, E.Y.S.; PRETE, C.E.; ITANO, E.N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y. Garantia na Segurança Alimentar: produção de reagentes imunológicos (anticorpo monoclonal) e metodologia analítica - imunoenensaio versus CLAE na detecção de ocratoxina em café. **Biosaúde**, v.6, p. 33-33, 2004. (Prêmio área Imunologia - 1º lugar, Universidade Estadual de Londrina - UEL).

REFERÊNCIAS

1. ACCENSI F., ABARCA M.L., CABAÑES F.J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. **Food Microbiology**, v. 21, p. 623-627, 2004.
2. AGUETE E.C., GAGO-MARTÍNEZ A., LEÃO J.M., RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ J.A., MENÀRD C., LAWRENCE J.F. HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. **Talanta**, v. 59, n. 4, p. 697-705, 2003.
3. ÁLVAREZ L., GIL A.G., EZPELETA O., GARCÍA-JALÓN J.A., LÓPEZ DE CERAIN A. Immunotoxic effects of ochratoxin A in wistar rats after oral administration. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 825-834, 2004.
4. AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB. Reversed Phase Chromatography: Principles and Methods, Sweden, 1999.
5. BARNA-VETRÓ I., SOLTI L., TÉREN J., GYÖNGYÖSI A., SZABÓ E., WÖLFLING A. Sensitive ELISA Test for determination of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 4071-4074, 1996.
6. BAU M, BRAGULAT MR, ABARCA ML, MINGUEZ S, CABAÑES F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 125-130, 2005.
7. BERENTE B., MÓRICZA A., H.-OTTA K., ZÁRAYA G., LÉKÓ L., RÁCZB L. Determination of ochratoxin A in Hungarian wines. **Microchemical Journal**, v. 79, p. 103-107, 2005.
8. BERG B. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? **Food Control**, v. 14, n. 4, p. 219-224, 2003.
9. BERG J.M., TYMOCZKO J.L., STRYER L. The molecular design of life. In: BERG J.M., TYMOCZKO J.L., STRYER L. **Biochemistry**. New York: W.H. Freeman and Co., 2002.
10. BIO-RAD LABORATORIES. Disponível em < http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9065.pdf > Acesso em abril 2005.
11. BLESJA J., BERRADA H., SORIANO J.M., MOLTÓ J.C., MAÑES J. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereals products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 127-131, 2004.

12. BRUCE M.P., BOYD V., DUCH C., WHITE J.R. Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies – alternatives to ascites production in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 264, p. 59-68, 2002.
13. BUSCARLET L., DONINI P., CRISTAU B., ARBAULT P. Validation of a new immunoassay or the direct detection of ochratoxin A in cereals and wine. In: NJAPAU H., TRUJILLO S., Van EGMOND H.P., PARK D.L. **XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, 2004. May 17-21, Bethesda, Maryland, USA. p. 59-60, 2004.
14. BUTTINGER G., FUCHS E., KNAPP H., BERTHILLER F., SCHUHMACHER R., BINDER E.-M., KRŠKA R. Performance of new clean-up column for the determination of ochratoxin A in cereals and foodstuffs by HPLC-FLD. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 11, p. 1107-1114, 2004.
15. CANDLISH A.A.G., STIMSON W.H., SMITH J.E. Determination of ochratoxin A by monoclonal antibody-based enzyme immunoassay. **Journal of AOAC International**, v. 71, n. 5, p. 961-964, 1988.
16. CASTELLARI M., FABRI S., FABIANI A., AMATI A., GALASSI S. Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 888, n. 1-2, p. 129-136, 2000.
17. CERNY T., POSAVAC J., SIKIRIC M., HOMEN B. New aspects of quality control in animal feed production -- quality assurance of raw material and finished products. **Krmiva**, v. 44, n. 1, p. 31-41, 2002.
18. CHENG Y.H., WU J.F., LEE D.N., YANG C.M.J. Prevalence of fumonisin contamination in corn and corn-based feeds in Taiwan. **Asian Australian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 4, p. 610-614, 2002.
19. CHOI S., CHOI E.Y., KIM D.J., KIM J., KIM T.S., OH S.W. A rapid, simple measurement in human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay. **Clinica Chimica Acta**, v. 339, p. 147-156, 2004.
20. CHOLMAKOV BODECHTEL C., WOLFF J., GAREIS M., BRESCH H., ENGEL G., MAJERUS P., ROSNER H., SCHNEIDER R. Ochratoxin A: representative food consumption survey and epidemiological analysis. **Archives Fuer Lebensmittelhygiene**, v. 51, n. 4/5, p. 111-115, 2000.
21. CHU F.S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 47, p. 562-569, 1984.
22. CHU F.S., LEE R.C., TRUCKSESS M.W., PARK D.L. Evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay of cleanup for Thin-Layer Chromatography of aflatoxin B1 in corn, peanuts, and peanut butter. **Journal of AOAC International**, v. 71, n. 5, p. 953-956, 1988.

23. DALL'ASTA C., GALAVERNA G., DOSSENA A., MARCHELLI R. Reversed-phase liquid chromatographic method for determination of ochratoxin A in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 275-279, 2004.
24. DANILOVA N.P. ELISA screening of monoclonal antibodies to haptens: influence of the chemical structure of hapten-protein conjugates. **Journal of Immunological Methods**, v. 173, p. 111-117, 1994.
25. de GIROLAMO A., SOLFRIZZO M., von HOLST C., VISCONTI A. Comparison of different extraction and clean up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 1, p. 59-67, 2001.
26. de SAEGER S., SIBANDA L., DESMET A., PETEGHEM C.V. A collaborative study to validate novel field immunoassay kits for rapid mycotoxin detection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 135-142, 2002.
27. DRAGACCI S., GROSSO F., GILBERT J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 2, p. 437-443, 2001.
28. ENTWISLE A.C., WILLIAMS A.C., MANN P.J., RUSSEL J., SLACK P.T., GILBERT J. Combined phenylsilane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 2, p. 444-450, 2001.
29. EUROPEAN COMMISSION. 2005. Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Communities** L25: 3-5, 2005.
30. FAO, Food and Agriculture Organization of United Nations. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. A compendium. FAO Food and Nutrition Paper No. 81. Rome, Italy, 2004.
31. FAO, Food and Agriculture Organization of United Nations. 2006. Reducing ochratoxin A in coffee [internet]. Disponível em < http://www.coffee-ota.org/ota_what.asp > Acesso em 20 março 2006.
32. FAZEKAS B., TAR A. Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 5, p. 1453-1459, 2001.
33. FINK-GREMMELS J., JAHN A., BLOM M.J. Toxicity and Metabolism of Ochratoxin A. **Natural Toxins**, n. 3, p. 214-220, 1995.

34. FRANK L.A., PETUNIN A.I., VYZOTSKI E.S. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label. **Analytical Biochemistry**, v. 325, issue 2, p. 240-246, 2004.
35. FUJII S., ONO E.Y.S., FUNGARO M.H.P., ITANO E.N., OLIVEIRA T.C.R.M., PRETE C.E.C., TANIWAKI M.H., KAWAMURA O., UENO Y., HIROOKA E.Y. Indirect competitive ELISA for ochratoxin A detection in coffee and molecular identification of ochratoxin A producing *Aspergillus* strains. In: NJAPAU H., TRUJILLO S., VAN EGMOND H.P., PARK D.L. **Mycotoxins and Phycotoxins, Advances in determination, toxicology and exposure management**. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2006 (a). p. 61-71.
36. FUJII S., ONO E.Y.S., RIBEIRO R.M.R., ASSUNÇÃO F.G.A., TAKABAYASHI C.R., OLIVEIRA T.C.R.M., ITANO E.N., UENO Y., KAWAMURA O., HIROOKA E.Y. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2005. *In Press, Corrected Proof*.
37. FUJII S., RIBEIRO R.M.R., SCHOLZ M.B.DOS S., ONO E.Y.S., PRETE C.E.C., ITANO E.N., UENO Y., KAWAMURA O., HIROOKA E.Y. Reliable indirect competitive ELISA for ochratoxin A survey in green coffee from the North of Paraná State, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 9, p. 902-909, 2006 (b).
38. FURLANI R.P.Z., OLIVEIRA P.L.C., SOARES L.M.V. Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cafés verdes e torrados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.2, p.87-98, 1999.
39. FURLONG E.B., SOARES L.M.V. Gas chromatographic method for quantitation and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 386-390, 1995.
40. GAZZAZ S.S., RASCO B.A., DONG F.M. Application of immunochemical assays to food analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 197-229, 1992.
41. GERING J.P., QUARONI L., CHUMANOV G. Immobilization of antibodies on glass surfaces through sugar residues. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 252, p. 50-56, 2002.
42. GILBERT J., ANKLAM E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6-7, p. 468-486, 2002.
43. GONZÁLEZ L., JUAN C., SORIANO J.M., MOLTÓ J.C., MAÑES J. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 223 – 227, 2006.
44. GONZÁLEZ-PEÑAS E., LEACHE C., VISCARRET M., OBANOS A.P., ARAGUÁS C., CERAIN A.L. Determination of ochratoxin A in wine using liquid-phase microextraction

combined with liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 163-168, 2004.

45. GROSSO F., SAÏD S., MABROUK I., FREMY J.M., CASTEGNARO M., JEMMALI M., DRAGACCI S. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 8, p. 1133-1140, 2003.
46. GUIMARÃES L.F. L., COLLINS C.H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS C.H., BRAGA G.L., BONATO P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1993. p.183-238.
47. HALSTENSEN A.S., NORDBY K.-C., ELEN O., EDUARD W. Ochratoxin A in grain dust estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM**, v. 11, n. 2, p. 245-254, 2004.
48. HARADA K.-I., MATSUURA K., SUZUKI M., OKA H., WATANABE M.F., OISHI S., DAHLEM A.M., BEASLEY V.R., CARMICHAEL W.W. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 448, p. 275-283, 1988.
49. HARLOW E., LANE D. Growing hybridomas. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (b). p. 245-281.
50. HARLOW E., LANE D. Monoclonal antibodies. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (a). p. 139-243.
51. HARLOW E., LANE D. Protein Techniques. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (e). p. 673.
52. HARLOW E., LANE D. Reagents. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (d). p. 615-622.
53. HARLOW E., LANE D. Storing and purifying antibodies. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (c). p. 283-318.
54. HARRIS J.P., MANTLE P.G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 5, p. 709-716, 2001.
55. HEFLE S.L. Immunoassay fundamentals. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 102-107, 1995.
56. HEILMANN K., GROTH TH., BEHRING O., ALBRECHT W., SCHOSSIG M., LENDLEIN A., MICHEEL B. The influence of the chemical composition of cell culture material on the

growth and antibody production of hybridomas cells. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 291-301, 2005.

57. HO J.-a.A., DURST R.A. Detection of fumonisin B1: comparison of flow-injection liposome immunoanalysis with high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 312, p. 7-13, 2003.
58. HO J.-a.A., DURST R.A. Preparation of reagents for the determination of fumonisin B1 by flow-injection immunoanalysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 414, p. 51-60, 2000.
59. HOFFMAN W.L., O'SHANNESY D.J. Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports. **Journal of Immunological Methods**, v. 112, n. 1, p. 113-120, 1988.
60. HOLTZAPPLE C.K., BUCKLEY S.A., STANKER L.H. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 754, p. 1-9, 2001.
61. HUSSEIN S.H., BRASEL J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
62. IARC, 1993. Ochratoxin A. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: Some Naturally Occurring Substances, Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. **International Agency for Research on Cancer** 56: 489-521, 1993.
63. IJIMA K., KAWAMURA O., WANG D.S., LIANG Y.X., CHEN G., YU S.Z., CHAU N.T., UENO Y. Development of highly sensitive immunosorbent assay for fumonisins and its application for contaminated corn. **Mycotoxins**, v. 42, p. 63-66, 1996.
64. JENNINGS J.C., KOLWYCK D.C., KAYS S.B. WHETSELL A.J., SURBER J.B., CROMWELL G.L., LIRETTE R.P., GLENN K.C. Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal. **J. Animal Science**, v. 81, n. 6, p. 1447-1455, 2003.
65. JURADO L.A., JARRET H.W. In flow activation of diol-silica with cyanogen bromide and triethylamine for preparing high-performance affinity chromatographic columns **Journal of Chromatography A**, v. 984, p. 9-17, 2003.
66. JURADO L.A., MOSLEY J., JARRET H.W. Cyanogen bromide activation and coupling of ligands to diol-containing silica for high-performance affinity chromatography – Optimization of conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 971, p. 95-104, 2002.

67. KAMP H.G., EISENBRAND G., SCHLATTER J., WÜRTH K., JANZOWSKI C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. **Toxicology**, v. 206, p. 413-425, 2005.
68. KAWAMURA O., SATO S., KAJII H., NAGAYAMA S., OHTANI K., CHIBA J., UENO Y. A sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent assay of Ochratoxin A based on Monoclonal Antibodies. **Toxicon**, v. 27, n. 8, p. 887-897, 1989.
69. KIM Y.J., CHO Y.A., LEE H.S., LEE Y.T., GEE S.J., HAMMOCK B.D. Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. **Analytica Chimica Acta**, v. 475, n. 1-2, p. 85-96, 2003.
70. KONDO F., ITO Y., YAMADA S., TSUJI K., IMOKAWA M., NIIMI Y., HARADA K.-I., UENO Y., MIYAZAKI Y. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. **Toxicon**, v. 40, p. 893-899, 2002.
71. KPODO K., SORENSEN A.K., JAKOBSEN M. The occurrence of mycotoxins in fermented maize products. **Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 147-153, 1996.
72. LA PINE T.R, HILL H.R. Monoclonal Antibodies. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 64-70, 2001.
73. LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
74. LAYNE E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 447-455, 1957.
75. LEGAZPI L., DÍAZ J., LACA A., DÍAZ M. Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: substrate and agitation effects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 122-130, 2005.
76. LEONI L.A.B., FURLANI R.P.Z., VALENTE SOARES L.M., OLIVEIRA P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian green coffees. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 105-107, 2001.
77. LEONI L.A.B., VALENTE SOARES L.M., OLIVEIRA P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 10, p.867-870, 2000.
78. LIDDELL J.E, CRYER A. Tissue culture techniques. In: Liddell J.E, Cryer A. **A Practical Guide to Monoclonal Antibodies**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 7-31.
79. LIN LC, CHEN PC, FU YM, SHIH DYC. Ochratoxin A contamination in coffees, cereals, red wines and beers in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13, n. 1, p. 84-92, 2005.

80. LLORENS A., MATEO R., MATEO J.J., JIMENEZ M. Comparison of extration and clean up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 3, p. 272-281, 2002.
81. LOBEAU M., de SAEGER S., SIBANDA L., BARNA-VETRÓ I., VAN PETEGHEM C. Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, p. 57-61, 2005.
82. MARTINS M.L., MARTINS H.M., GIMENO A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 12, p. 1127-1131, 2003.
83. MATEO J.J., LLORENS A., MATEO R., JIMENEZ M. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. **Journal of Chromatography A**, v. 918, n. 1, p. 99-112, 2001.
84. MATRELLA R., MONACI L., MILILLO M.A., PALMISANO F., TANTILLO M.G. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. **Food Control**, v. 17, p. 114-117, 2006.
85. MCKINNEY M.M., PARKINSON A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **Journal of Immunological Methods**, v. 96, p. 271-278, 1987.
86. MELUCCI D., GUARDIGLI M., RODA B., ZATTONI A., RESCHIGLIAN P., RODA A. A new method for immunoassays using field-flow fractionation with on-line, continuous chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 60, n. 2-3, p. 303-312, 2003.
87. MICOTOXINAS ON LINE. Legislação Nacional e Internacional de Micotoxinas. Disponível em < <http://www.micotoxinas.com.br> > Acesso em 20 março 2006.
88. MOGHADDAM A., LOBERSLI I., GEBHARDT K., BRAUNAGEL M., MERVIK O.J. Selection and characterization of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naïve recombinant antibody libraries. **Journal of Immunological Methods**, v. 254, p. 169-181, 2001.
89. MONTEIRO M.C., TRUGO L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v.28, n.4, p. 637-641, 2005.
90. MORAN E., O'KEEFFE M., O'CONNOR R., LARKIN A.M., MURPHY P., CLYNES M. Methods for generation of monoclonal antibodies to the very small drug hapten, 5-benzimidazolecarboxylic acid. **Journal of Immunological Methods**, v. 271, p. 65-75, 2002.

91. MORO A.M., RODRIGUEZ M.T.A. Anticorpos monoclonais para a clínica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.22, p. 32-35, 2001.
92. MOUYNA I., SARFATI J., RECCO P., FONTAINE T., HENRISSAT B. AND LATGE J.P. Molecular characterization of a cell wall-associated beta (1-3) endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 40, n. 5, p. 455-464, 2002.
93. NAKAJIMA M., TERADA H., HISADA K., TSUBOUCHI H., YAMAMOTO K., UDA T., ITOH Y., KAWAMURA O., UENO Y. Determination of Ochratoxin A in Coffee Beans and Coffee Products by Monoclonal Antibody Affinity Chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, v.2, p. 189-195, 1990.
94. NAKANO T., NAGATA A. ELISAs for free light chains of human immunoglobulins using monoclonal antibodies: comparison of their specificity with available polyclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 275, n. 1-2, p. 9-17, 2003.
95. NEWSOME W.H. Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods. Review: Immunochemical Methods. **Journal of AOAC International**, v. 69, n. 6, p. 919-923, 1986.
96. NGUNDI M.M., SHRIVER-LAKE L.C., MOORE M.H., LASSMAN M.E., LIGLER F.S., TATITT C.R. Array biosensor for detection of ochratoxina A in cereals and beverages. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 148-157, 2005.
97. NUNES I.L., MAGAGNIN G., BERTOLIN T.E., FURLONG E.B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.
98. O'BRIEN E., DIETRICH D.R. Ochratoxin A: the continuing enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 33-60, 2005.
99. OLIVEIRA A.Q., SOARES L.M.V., SAWAZAKI E., OLIVEIRA A.Q. Survey of deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, and T2 toxin in popcorn hybrids planted in the state of São Paulo and in popcorn commercialized in the city of Campinas, SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 330-333, 2001.
100. ONO E.Y.S., KAWAMURA O., ONO M.A., UENO Y., HIROOKA E.Y. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5-14, 2000.
101. PARDO E., MARÍN S., RAMOS A.J., SANCHIS V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochartoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2004.

102. PARK J.W., CHUNG S.-H., KIM Y.-B. Ochratoxin a in korean food commodities: occurrence and safety evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4637-4642, 2005.
103. PASCALE M., HAIDUKOWSKI M., VISCONTI A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. **Journal of Chromatography A**, v. 989, p. 257-264, 2003.
104. PESTKA J.J., ABOUZIED M.N., SUTIKNO T. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 120-128, 1995.
105. PESTKA J.J., AZCONA-OLIVEIRA J.I., PLATTNER R.D., MINERVINI F., DOKO M.B., VISCONTI A. Comparative assessment of fumonisin in grain based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 2, p. 169-172, 1994.
106. PETTERSSON H., ABERG L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. **Food Control**, v. 14, n. 4, p. 229-232, 2003.
107. PETZINGER E., WEIDENBACH A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 245-250, 2002.
108. PFEIFFER N.E., WYLIE D.E., SCHUSTER S.M. Immunoaffinity chromatography utilizing monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 97, p. 1-9, 1987.
109. PITTET A., ROYER D. Rapid, low cost thin layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at control level of 10 µg/kg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.2, p.243-247, 2002.
110. PITTET A., TORNARE D., HUGGETT A., VIANI R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using na immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3564-3569, 1996.
111. POOLE C.F. New trends in solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 362-373, 2003.
112. PRADO G., OLIVEIRA M.S., ABRANTES F.M., SANTOS L.G. DOS, VELOSO T., BARROSO R.E .DE S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 192-196, 2000.
113. R-BIOPHARM RHÔNE Ltd. Disponível em < <http://www.r-biopharmrhone.com/pro/myco.html> > Acesso em abril 2005.

114. REINSCH M., TÖPFER A., LEHMANN A., NEHLS I. Determination of ochratoxin A in wine by liquid chromatography tandem mass spectrometry after combined anion-exchange/reversed-phase clean-up. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 8. p. 1592-1595, 2005.
115. RHEMREV-BOOM M.M., YATES M., RUDOLPH M., RAEDTS M. (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.
116. RUHN P.F., GARVER S., HAGE D.S. Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 669, p. 9-19, 1994.
117. SAEZ J.M., MEDINA A., GIMENO-ADELANTADO J.V., MATEO R., JIMÉNEZ M. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1029, issue 1-2, p. 125:133, 2004.
118. SCOTT P.M., TRUCKSESS M.W. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 5, p. 941-949, 1997.
119. SCUDAMORE K.A., MACDONALD S.J. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 4, p. 401-410, 1998.
120. SHARMA M., MÁRQUEZ C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. **Animal Feed Science and Technology**, v. 93, p. 109-114, 2001.
121. SHELVER W.L., SHAN G., GEE S.J., STANKER L.H., HAMMOCK B.D. Comparison of immunoaffinity column recovery patterns of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/polychlorinated dibenzofurans on columns generated with different monoclonal antibody clones and polyclonal antibodies. **Analytica Chimica Acta**, v. 457, p. 199-209, 2002.
122. SHIM W-B., KOLOSOVA A.Y., KIM Y.-J., YANG Z.-Y., PARK S.-J., EREMIN S.A., LEE I.-S., CHUNG D.-H. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 829-837, 2004.
123. SIBANDA L., de SAEGER S., BAUTERS T.G.M., NELIS H.J., van PETEGHEM C. Development of a Flow through enzyme immunoassay and application in screening green coffee samples for ochratoxin A with confirmation by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 10, p. 1597-1602, 2001.
124. SIBANDA L., de SAEGER S., van PETEGHEM C. Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. **Journal of Chromatography A**, v. 59, n. 1-2, p. 327-330, 2002.

125. SIEGEL D.L. Recombinant monoclonal antibody technology. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 9, p. 15-22, 2002.
126. SOARES L.V. Noções de controle de qualidade e segurança de qualidade analítica. In: SOARES L.V. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri-SP: Manole, 2006. p.43-51.
127. SPILLANE D., O'MULLANE J. Development of an affinity-column-mediated enzyme-linked immunosorbent assay for ferritin. **Clinica Chimica**, v. 273, p. 81-87, 1998.
128. STANCZYK F.Z., CHO M.M., ENDRES D.B., MORRISON J.L., PATEL S., PAULSON R.J. Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. **Steroids**, v. 68, p. 1173-1178, 2003.
129. STROKA J., ANKLAM E., JORISSEN U., GILBERT J. Determination of aflatoxins B1 in baby food (infant formula) by immunoaffinity column clean-up liquid chromatography with postcolumn bromination: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 4, p. 1116-1123, 2001.
130. STROKA J., ANKLAM E., JORISSEN U., GILBERT J. Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 2, p. 320-340, 2000.
131. SUGITA-KONISHI Y., TANAKA T., NAKAJIMA M., FUJITA K., NORIZUKI H., MOCHIZUKI N., TAKATORI K. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. **Talanta**, v. 69, p. 650-655, 2006.
132. SWEENEY M.J., DOBSON A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, n. 2, p. 149-163, 1999.
133. SYDENHAM E.W., SHEPHARD G.S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT J. **Progress in Food Contaminants Analysis**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p.65-146.
134. TACKE B.K., CASPER H.H. Determination of deoxynivalenol in wheat, barley and malt by column clean-up and gas chromatography with electron capture detection. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 2, p. 472-475, 1996.
135. TANIWAKI M.H., PITT J.I., TEIXEIRA A.A., IAMANAKA B.T. The source of ochratoxin A and Brazilian coffee and its formation and relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 173-179, 2003.

136. THIRUMALA D.K., MAYO M.A., GOPAL R., REDDY S.V., DELFOSSE P., REDDY D.V.R. Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 5079-5082, 2000.
137. TONHI E., COLLINS K. E., JARDIM I. C. S. F., COLLINS C. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616 - 623, 2002.
138. TUOMOLA M., HARPIO R., MIKOLA H., KNUUTTILA P., LINDSTRÖM M., MUKKALA V.-M., MATIKAINEN M.-T., LÖVGREN T. Production and characterization of monoclonal antibodies against a very small hapten, 3-methylindole. **Journal of Immunological Methods**, v. 240, p. 111-124, 2000.
139. UENO Y., AOYAMA S., SUGIURA Y. A limited survey of fumonisins in corn end corn-base products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v. 9, p. 27 - 34, 1993.
140. URBANO G.R., TANIWAKI M.H., LEITÃO M.F.F., VICENTINI M.C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, 2001.
141. VALENTA H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 75-92, 1998.
142. van der GAAG B., SPATH S., DIETRICH H., STIGTER E., BOONZAAIJER G., VAN OSENBRUGGEN T., KOOPAL K. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. **Food Control**, v. 14, n. 4, p. 251-254, 2003.
143. van EGMOND H.P. Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 5, p.1152-1160, 2004.
144. VANKOVÁ R., GAUDINOVÁ A., SÜSSENBEKOVÁ H., DOBREV P., STRNAD M., HOLÍK J., LENFELD J. Comparison of oriented and random antibody immobilization in immunoaffinity chromatography of cytokinins. **Journal of Chromatography A**, v. 811, p. 77-84, 1998.
145. VARGAS E.A., SANTOS E.A., LIMA F.B., SOUZA S.M., FRANÇA R.C.A., SOUZA S.E., AMORIM S.S., BATISTA L.R., CORRÊA T.B.S., ARAÚJO J.L.S.S., PFENNING L.H., PEREIRA R.T.G., NOGUEIRA M.D.. Influence of coffee processing and defects on the incidence and occurrence of ochratoxin A. In: NJAPAU H., TRUJILLO S., Van EGMOND H.P., PARK D.L. **XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, 2004. May 17-21, Bethesda, Maryland, USA. p. 84-85, 2004.
146. VENTURA M., ANAYA I., BROTO-PUIG F., AGUT M., COMELLAS L. Two-Dimensional Thin-Layer Chromatographic Method for the Analysis of Ochratoxin A in Green Coffee. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1920-1922, 2005.

147. VISCONTI A., PASCALE M., CENTONZE G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, p. 321-326, 2000.
148. WATANABE E., YOSIMURA Y., YUASA Y. AND NAKAZAWA, H. Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits. **Analytica Chimica Acta**, v. 433, p. 199-206, 2001.
149. WEWETZER K, DILMAGHANI K. Exposure to dimethyl sulfoxide at 37° C prior to freezing significantly improves the recovery of cryopreserved hybridomas cells. **Cryobiology**, v. 43, p. 288-292, 2001.
150. WHITAKER T. B. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control**, v. 14, n. 4, p. 233-237, 2003.
151. WIMALASENA R.L., WILSON G.S. Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments. **Journal of Chromatography**, v. 572, p. 85-102, 1991.
152. WYATT, G. M. **Immunoassays for food poisoning bacteria and bacterial toxins**. Londres: Chapman & Hall. 1992.
153. XIAO H., CLARKE J., MARQUARDT R.R. AND FROHLICH A.A. Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2092-2097, 1995 (a).
154. XIAO H., MADHYASTHA S., MARQUARDT R.R., LI S., VODELA J.K., FROHLICH A.A., KEMPPAINEN B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: estructure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 137, n. 2, p. 182-192, 1996.
155. XIAO H., MARQUARDT R.R., FROHLICH A.A., LING Y.Z. Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 524-530, 1995 (b).
156. ZHANG J., TANHA J., HIRAMA T., TO N.H.K.R., TONG-SEVINC H., STONE E., BRISSON J. -R., MACKENZIE C.R. Pentamerization of single- domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibodies reagents. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, p. 49-56, 2004.
157. ZHAO M., LIU Y., LI Y., ZHANG X., CHANG W. Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 401-410, 2003.

158. ZHENG Z., HANNEKEN J., HOUCINS D., KING R.S., LEE P., RICHARD J.L. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. **Mycopathologia**, v. 159, p. 265-272, 2005.

159. ZINEDINE A., BRERA C., ELAKHDARI S., CATANO C., DEBEGNACH F., ANGELINI S., DE SANTIS B., FAID M., BENLEMLIH M., MINARDI V., MIRAGLIA M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**, v.17, p. 868–874, 2006.