



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANI LUCE DORO DA SILVA

**ANTICORPO MONOCLONAL DE ALTA EFICIÊNCIA NO
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOQUÍMICA APLICADA:
ANÁLISE DE OCRATOXINA EM VINHO**

DANI LUCE DORO DA SILVA

**ANTICORPO MONOCLONAL DE ALTA EFICIÊNCIA NO
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOQUÍMICA APLICADA:
ANÁLISE DE OCRATOXINA EM VINHO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D715a Doro-da-Silva, Dani Luce.

Anticorpo monoclonal de alta eficiência no desenvolvimento de imunquímica aplicada : análise de ocratoxina em vinho / Dani Luce Doro-da-Silva. – Londrina, 2010.

132 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2010.

Inclui bibliografia.

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

CDU 641:577.1

DANI LUCE DORO DA SILVA

**ANTICORPO MONOCLONAL DE ALTA EFICIÊNCIA
NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNOQUÍMICA APLICADA:
ANÁLISE DE OCRATOXINA EM VINHO**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Vildes Maria Scussel
UFSC – Florianópolis – SC

Prof. Dr Miguel Machinski Junior
UEM – Maringá - PR

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de
Oliveira
UEL – Londrina - PR

Londrina, 13 de dezembro de 2010.

*Ao meu querido Deus, por permitir que eu chegasse até
aqui e por me mostrar Sua vontade para minha vida;
Ao meu pai Hati, que está na eternidade, por ter sempre me
ensinado o valor de estudar e à minha mãe Adélia, por seu
amor e exemplo de vida.
Ao meu esposo Willian; por todo amor, carinho, paciência e
incentivo constante; indispensáveis para que eu tivesse
coragem de concluir essa etapa.
Ao meu filho Davi, que chegou durante esse período para
alegrar ainda mais nossa vida.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, por ter me aceitado para orientação e por todo conhecimento científico repassado, também pela amizade, incentivo e por ensinar com sua vida valores como o respeito, a humildade e o desprendimento, muito obrigada;

À Universidade Estadual de Londrina por oferecer toda estrutura necessária ao desenvolvimento desta tese de doutorado e aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos, colaboração e amizade;

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

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

À Fundação Araucária Paraná, Fundação/SETI, CNPq/MAPA e Rede Nanobio/CAPES pelo apoio financeiro;

Ao Dr. Osamu Kawamura de Kagawa University, Japão, pelo fornecimento de hibridomas anti-OTA.1 e por todo conhecimento técnico repassado ao nosso grupo de pesquisa, indispensável para a continuidade dos trabalhos;

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela sua disponibilidade em trazer os hibridomas do Japão e em orientar no cultivo dos mesmos, bem como na confecção de coluna de imunoafinidade, disponibilizando seu laboratório e materiais;

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela amizade, disponibilidade, orientações e sugestões sempre oportunas e participação na banca de Qualificação do doutorado;

Ao Departamento de Bioquímica por disponibilizar o equipamento de CLAE e outros materiais e ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez pelo auxílio na utilização;

À Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira pela amizade e participação na banca de Qualificação do Doutorado, bem como pelas sugestões para melhoria do trabalho;

Ao prof. Dr. Mário Augusto Ono, pela colaboração e empréstimo da leitora de microplacas;

À Profa. Dra. Marta Toledo Benassi pelos momentos de descontração, amizade e incentivo;

À profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf pela amizade, auxílio e fornecimento de amostras de vinho;

Ao prof. Dr. Edson Lavado pela disponibilidade em fazer as análises estatísticas;

À Doutora Joice Sifuentes dos Santos e a doutoranda Cássia Reika Takabayashi por toda amizade, carinho, momentos de descontração e alegria, ensinamentos sobre o cultivo de hibridomas, dicas de informática, ajuda nos experimentos e por toda troca de experiência e discussão sobre nossos trabalhos ao longo desses anos;

À doutoranda Tatiana Avila Miguel e às mestres Vergínia de Almeida Falcão e Luciana Ferreira pelo auxílio na utilização do equipamento de CLAE e pelo bom convívio no período de análises;

A Dra. Simone Fujii por ter montado o laboratório de cultura de células e iniciado o cultivo de hibridomas durante seu doutorado e ainda deixado preciosos ensinamentos escritos para os próximos alunos, minha admiração e agradecimento.

À doutoranda Luciene Airy Nagashima pela disponibilidade em auxiliar no cultivo de hibridomas.

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Sandra Rezende, Berenice, Maria Alice, Alessandra, Marli, Irene, Célia, Neusa, Nelson, pela ajuda, amizade e boa convivência, durante toda esta etapa;

À Elza Youssef, pela amizade, colaboração e bons conselhos.

À Patrícia Sambatti, pela amizade, respeito e auxílio sempre oportuno;

Aos amigos e colegas que convivi durante esses anos: Luciana Lobato, Caroline Calliari, Giselle Nobre, Lucianad Bernd, Mariana Egea, Cristiane Canan, Luciane Yoshiara, Agnes Nagashima, Dênis Marchi, Michele Rosset, Marciane Magnani, Ana Paula Bilk, Maria da Graça, Cleuza, Kérley Casaril, Tatiane Martins de Oliveira, Diogo Pedrollo, Renata Sobotka, Cleiton Ramos, Wagner Risso, Leandro Ferrari, Carolina Rossi, Thiago Montagner, Angélica Ishikawa, Karla Guergueletto, Waneska Franco; pelos momentos de descontração, boas conversas, incentivo e ajuda;

Aos estagiários: Ligia Martins, Jayme Almeida Filho, Livia Médici, Maísa Almeida Leite, pela colaboração e amizade;

Aos professores e colegas participantes do grupo de Pesquisa.

À vinícola da família de Dionízio Sandi, Bituruna-Pr, pelo fornecimento de amostras de vinho;

Aos meus colegas de trabalho do laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação Celular pelo apoio e incentivo, em especial à Marlene Bardi, pela amizade, compreensão e flexibilização dos horários para o término desta tese.

A todos aqueles que durante esses anos contribuíram de alguma maneira para a concretização desse trabalho, sejam colegas, profissionais, servidores ou empresas.

À minha família, em especial minha amada mãe, que mesmo longe está sempre ao meu lado, me incentivando, ajudando e demonstrando seu amor, muito obrigada.

Às minhas queridas irmãs Ieda, Eliane e Francieli que fazem parte da minha vida e da minha história, obrigada por vocês existirem e me darem meus amados sobrinhos Leonardo, Jéssica, Bruna, Milena, Daiane, Ana Beatriz e Laís Fernanda.

Aos meus sogros, Salmen e Madalena, pelo carinho, amizade, incentivo e ajuda.

Aos meus cunhados Alex, Miguel, Antônio e Janio e à minha futura cunhada Jéssica pelo apoio, amizade e boa convivência;

A comunidade CEFAS, meus queridos irmãos na fé, obrigada pelo incentivo e orações.

Ao meu esposo Willian e ao meu filho Davi, minha sagrada família, vocês são meus amados. Obrigada pela compreensão, amor, paciência, cuidado e apoio ao longo desses anos tornando possível a finalização desta tese.

DORO da SILVA, Dani Luce. **Anticorpo monoclonal de alta eficiência no desenvolvimento de imun química aplicada - análise de ocratoxina em vinho.** 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

O agronegócio globalizado, cada vez mais competitivo, exige segurança com enfoque na legislação sanitária perante alimento saudável aos consumidores. No cenário, o controle de Ocratoxina A (OTA) em produtos derivados de uva, com ênfase ao vinho, já é uma realidade na Comunidade Européia, cujo monitoramento contínuo deve ser executado empregando métodos confiáveis e acessíveis. Em contraste ao iminente lançamento de biosensores, capazes de conferir rapidez na análise *in loco*, o Brasil ainda é dependente de *kits* analíticos importados, cujo custo restringe o amplo monitoramento na rotina de controle de qualidade. Considerando que ensaios imunológicos, a exemplo de ELISA, seja a base para avanço tecnológico – biosensores, procedeu-se desde o cultivo de hibridoma OTA.1 em meio sintético, visando produção de imunorreagente. O anticorpo monoclonal (AcM) IgG anti-OTA obtido foi aplicado no desenvolvimento de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) e coluna de imunoafinidade (IAC). O cultivo de hibridoma OTA.1 iniciado em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino foi gradativamente adaptado até 100% de meio H-SFM (*Hybridoma-Serum Free Medium*). O AcM de maior pureza produzido (meio 100% H-SFM) apresentou título de 1:10.000, analisado por ic-ELISA, sendo utilizado juntamente com o conjugado OTA-BSA na diluição de 1:30.000. A validação intra-laboratorial foi realizada, procedendo comparação com CLAE para análise de OTA em vinho tinto (VT), rosado (VR) e branco (VB). Os parâmetros avaliados consistiram de limite de detecção (0,17; 0,15 e 0,14 ng/mL para VT, VR e VB respectivamente); quantificação (1,29; 0,91 e 0,64 ng/mL para VT, VR e VB); exatidão (recuperação média de 90,6%; 89,2% e 89,6% para VT, VR e VB); linearidade; precisão avaliada em termo de repetibilidade (RSD de 9,41; 8,01 e 9,29%, respectivamente para VT, VR e VB) e precisão intermediária (RSD de 15,81; 12,66 e 12,65%). A incerteza padrão máxima foi calculada para três níveis de contaminação de OTA (0,5; 2 e 5 ng/mL) obtendo-se para 0,5 ng/mL 26, 25 e 24% para VT, VR e VB, respectivamente, e incerteza de 20% para níveis de OTA de 2 e 5 ng/mL para as três matrizes. O ic-ELISA desenvolvido apresentou correlação de $R=0,975$ com CLAE, na análise de 14 amostras positivas, do total de 70 vinhos comerciais (47 VT e 23 VB). Consequentemente, CLAE detectou positividade em 14 amostras, divididas em 10 VT (0,14 a 0,99 ng/mL) e em 4 VB (0,33 a 0,90 ng/mL). O ic-ELISA detectou 12 amostras positivas, divididas em 8 VT (0,26 a 0,86 ng/mL) e 4 VB (0,29 a 1,12 ng/mL). Paralelamente, CIA baseada em suporte ativado Affi-Gel 10 foi confeccionada com AcM IgG obtido de cultivo em 75 e 100% H-SFM (1:1) nas concentrações de 5, 10 e 20 mg de IgG/mL de gel; as CIAs desenvolvidas foram denominadas CIA 5, 10 e 20, respectivamente. Comparando a eficiência de etanolamina e glicina no capeamento pós-imobilização de IgG (*end-capping*), ambas apresentaram resultados similares. A etanolamina foi escolhida para continuidade da padronização, em virtude de menor custo, obtendo-se eficiência da imobilização de AcM de 86,43% para CIA 5; 85,18 % para CIA 10 e 88,50% para CIA 20. A seguir, a capacidade de retenção de toxina pela coluna desenvolvida foi avaliada aplicando 20 ng de OTA; CIA 5 reteve 72,08%, CIA 10, 76,85% e CIA 20, 67,20% de OTA. A atividade específica foi de 6,54 ng de OTA retida/mg de IgG imobilizada para CIA 5; 3,58 para CIA 10 e 1,50 para CIA 20. A CIA 10 e CIA 5 apresentaram a efetividade de recuperação de OTA similar, quando testadas em

concentrações entre 0,5 a 15 ng em tampão PBS-bicarbonato de sódio 1% ($p < 0,05$). Portanto, a CIA 5 foi selecionada para prosseguir o estudo de validação (taxa de recuperação de OTA em VT artificialmente contaminado, detecção de OTA em vinhos naturalmente contaminados e reuso de coluna). Assim, a CIA 5 foi comparada com CIA comercial, avaliando a eficiência na recuperação de OTA em vinho tinto artificialmente contaminado (0,5; 2; 5 ng/mL). A CIA 5 recuperou 80,5 % de OTA em vinho contaminado com 0,5 ng de OTA/mL, em relação a 77% de recuperação obtida em CIA comercial. Contaminando o vinho tinto com 2 ng de OTA/mL, a recuperação atingida pela CIA 5 foi de 76,87%, em relação a 86,14% pela CIA comercial. Contaminando com 5 ng de OTA/mL, a CIA 5 recuperou 76,75%, em relação a 84,97 % pela CIA comercial. Entretanto, CIA desenvolvida e comercial não apresentaram diferença significativa perante taxa de recuperação nas concentrações testadas ($p < 0,05$). A aplicabilidade de CIA 5 desenvolvida foi testada perante 14 amostras naturalmente contaminadas (10 VT e 4 VB). A alta correlação, observada entre CIA 5 e CIA comercial ($R = 0,954$), confirma a aplicabilidade desta imunoferramenta desenvolvida com suporte Affi-Gel no controle de qualidade de vinho. A regeneração de coluna visando reuso foi avaliada, procedendo cinco determinações consecutivas para três concentrações de OTA (0,5; 2 e 5 ng/mL de vinho). A CIA 5 apresentou possibilidade de reuso após duas regenerações, demonstrando aplicabilidade em vinho tinto por até três usos. Resumindo, a alta especificidade do AcM produzido por hibridoma OTA.1 atingindo título de 1:10.000, preenche a condição essencial requerida para desenvolvimento de biossensor que juntamente com o conjugado OTA-BSA estável com fator de diluição de trabalho de 1:30.000 em ic-ELISA, constitui-se em reagente promissor para emprego em bioferramentas sensíveis. Portanto, a melhoria na tecnologia de produção de imunoreagentes deve ser continuada, tendo em vista posição estratégica no contexto de nanobiotecnologia.

Palavras - chave: Anticorpo monoclonal. ic-ELISA. Coluna de imunoafinidade. Ocratoxina.

DORO da SILVA, Dani Luce. **Monoclonal antibody with high efficiency in the development of applied immunochemistry - analysis of OTA in wine**. 2010. 132 f. PhD (Thesis in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The globalized agribusiness, increasingly competitive, requires safety with a focus on health legislation before healthy food to consumers. In this scenario, the control of Ochratoxin A (OTA) in grape-derived products, with emphasis on wine is already a reality in the European Union, whose continuous monitoring should be performed using reliable and accessible methods. In contrast to the imminent launch of biosensors, capable of making rapid analysis in situ the Brazil is still dependent on analytical imported kits, which cost restricts the broad monitoring in routine of quality control. Whereas, immunochemicals methods such ELISA, is the basis for technological advancement - biosensors, proceeded from the cultivation of hybridoma OTA.1 in synthetic medium, aiming production of immunoreagent. The monoclonal antibody (MAb) IgG anti-OTA obtained was applied in the development of indirect competitive ELISA (ic-ELISA) and immunoaffinity column (IAC). Cultivation of hybridoma OTA.1 initiated in RPMI medium with 10% of fetal bovine serum was gradually adapted until 100% of the H-SFM (Hybridoma Serum-Free Medium). The mAb with higher purity showed titer of 1:10,000, analyzed by ic-ELISA being used with the OTA-BSA conjugate at a dilution of 1:30,000. Intra-laboratory validation was carried out, proceeding with comparison to HPLC analysis of OTA in red wine (RE), rose (RO) and white (WH). The parameters evaluated were the detection limit (0.17, 0.15 and 0.14 ng ml⁻¹ for RE, RO and WH respectively), quantification (1.29, 0.91 and 0.64 ng ml⁻¹ for RE, RO and WH), accuracy (average recovery of 90.6%, 89.2% and 89.6% for RE, RO and WH), linearity, precision evaluated in terms of repeatability (RSD of 9.41, 8.01 and 9.29%, respectively for RE, RO and WH) and intermediate precision (RSD of 15.81, 12.66 and 12.65%). The maximum standard uncertainty was calculated for three contamination levels of OTA (0.5, 2 and 5 ng ml⁻¹), obtained 26, 25 and 24% to 0.5 ng ml⁻¹ for RE, RO and WH, respectively, and uncertainty of 20% for OTA levels of 2 and 5 ng ml⁻¹ for the three matrix. The ic-ELISA developed showed correlation of R= 0.975 with HPLC analysis of 14 positive samples, out of 70 commercial wines (47 RE and 23 WH). Consequently, HPLC detected positivity in 14 samples, divided into 10 RE (0.14 to 0.99 ng ml⁻¹) and 4 WH (0.33 to 0.90 ng ml⁻¹). The ic-ELISA detected 12 positive samples, divided into 8 RE (0.26 to 0.86 ng ml⁻¹) and 4 WH (0.29 to 1.12 ng ml⁻¹). In parallel, IAC based on support activated Affi-Gel 10 was prepared with mAb IgG obtained from cultivation at 75 and 100% H-SFM (1:1) at concentrations of 5, 10 and 20 mg of IgG /mL of gel; the IACs developed were called IAC 5, 10 and 20, respectively. Comparing the efficiency of ethanolamine and glycine in the capping post-immobilization of IgG (end-capping), both showed similar results. The ethanolamine was chosen to continue the standardization, because of lower cost, resulting in immobilization efficiency of 86.43% to IAC 5; 85.18% to IAC 10 and 88.50% to IAC 20. Next, the capacity of retention of toxin by the column was evaluated by applying 20 ng of OTA; IAC 5 retained 72.08%, IAC 10, 76.85% and IAC 20, 67.20% of OTA. The specific activity was 6.54 ng of OTA retained/ mg of IgG immobilized to IAC 5, 3.58 for 10 IAC and 1.50 for IAC 20. The IAC 10 and IAC 5 recovered OTA with similar effectiveness at concentrations between 0.5 and 15 ng in PBS-1% sodium bicarbonate (p <0.05). The IAC 5 was chosen to proceed the intra-laboratory validation by comparing with IAC commercial. Was evaluated the recovery rate of OTA in red wine (RE) artificially contaminated; detection of OTA in naturally

contaminated wine and reusing column. The effectiveness of IAC 5 was compared with IAC commercial, evaluating the recovery efficiency of OTA in red wine spiked (0.5, 2, 5 ng ml⁻¹). The IAC 5 recovered 80.5% of OTA in spiked wine with 0.5 ng ml⁻¹ compared to 77% of recovery obtained by IAC commercial. RE spiked RE with 2 ng of OTA ml⁻¹, the recovery achieved by the CIA 5 was 76.87% against 86.14% for CIA commercial. Spiking with 5 ng OTA ml⁻¹, the CIA 5 recovered 76.75% 84.97% for the CIA commercial. However, was not found significant difference between IAC developed and commercial in recovery rate for tested concentrations ($p < 0.05$). Assessing the applicability of the IAC developed against 14 naturally contaminated samples (10 RE and 4 WH). The high correlation observed between IAC 5 and IAC commercial ($R = 0.954$) confirms the applicability of immuno tool developed with Affi-Gel support for the control quality of wine. The column regeneration was evaluated in order to reuse carrying five consecutive determinations for three concentrations of OTA (0.5, 2 and 5 ng ml⁻¹ of wine). The IAC 5 presented the possibility of reuse after two regenerations, demonstrating applicability in red wine for up to three uses. Summarizing, the high specificity of mAb produced by hybridoma OTA.1 reaching title of 1:10,000 fill up the essential condition requested by development of biosensor, which coupled with the stable OTA-BSA conjugate at working-dilution factor of 1:30,000 by ic-ELISA, would be a promising reagent to engage into sensitive biotool. Therefore improvement on production technology concerning immunoreagents should be continued, taking to account its strategic status within the background of nanobiotechnology.

Keywords: Monoclonal antibody. ic-ELISA. Immunoaffinity column. Ochratoxin.

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 – Reatividade cruzada de anticorpo monoclonal IgG anti-OTA.1	66
Tabela 2 – Adaptação de hibridoma OTA.1 ao meio H-SFM: produção, purificação e atividade de anticorpo monoclonal Anti-OTA	67
Tabela 3 – Caracterização de CIA (5, 10 e 20) confeccionada com suporte Affi-Gel 10: concentração de AcM IgG anti-OTA adicionado e efeito de agente bloqueador na eficiência de imobilização, capacidade de retenção de OTA e atividade específica	75

Artigo

Table 1 – Accuracy of HPLC and ic-ELISA evaluated through OTA recovery from pool of spiked red, rose and white wines	99
Table 2 – Comparative study for OTA analysis in naturally contaminated red and white wine samples by ic-ELISA and HPLC	94
Table 3 – Precision analysis under repeatability and intermediate precision conditions of the ic-ELISA and HPLC method for OTA analysis	96

Artigo

Tabela 1 – Percentagem de retenção de OTA (em tampão PBS-bicarbonato de sódio 1%) adicionada em CIA Affi-Gel (CIA 5 e CIA 10)	106
Tabela 2 – Comparação entre CIA comercial e CIA 5 na recuperação de OTA de vinho tinto artificialmente contaminado	107
Tabela 3 – Estudo comparativo entre CIA comercial e CIA Affi-Gel (CIA 5) na determinação de OTA de vinhos tinto e branco naturalmente contaminados	109
Tabela 4 – Recuperação de OTA de vinho tinto artificialmente contaminado por CIA Comercial e CIA 5 durante cinco usos sucessivos e eficiência das CIA após cada uso	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas de ocratoxinas e seus análogos.....	29
Figura 2 – Esquema de ic-ELISA para detecção de OTA.....	35
Figura 3 – Procedimento de limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade	40
Figura 4 – Imobilização orientada e aleatória de IgG em suporte sólido	41

Material e Métodos

Figura 1 – Fluxograma de delineamento experimental total	43
Figura 2 – Reativação, cultivo e manutenção de hibridoma OTA.1 para produção de IgG anti-OTA em meio sintético H-SFM.....	44
Figura 3 – Preparação de conjugado OTA-BSA	45
Figura 4 – Determinação de atividade de AcM IgG anti-OTA por i-ELISA	46
Figura 5 – Perfil do título de AcM IgG anti-OTA por i-ELISA.....	47
Figura 6 – Padronização de ic-ELISA: determinação de diluição ótima de conjugado OTA-BSA e de título de AcM IgG anti-OTA	48
Figura 7 – Extração de OTA para análise por ic-ELISA.....	49
Figura 8 – Análise de OTA por ic-ELISA para vinho tinto, rosado e branco	50
Figura 9 – Validação intra-laboratorial de ic-ELISA para análise de vinho tinto, rosado e branco.....	51
Figura 10 – Extração e análise de OTA por CLAE	52
Figura 11 – Desenvolvimento de CIA Affi-Gel utilizando AcM IgG anti-OTA	53
Figura 12 – Caracterização de CIA Affi-Gel desenvolvida perante eficiência de imobilização de IgG, retenção de OTA e atividade específica	54
Figura 13 – Validação intralaboratorial de CIA Affi-Gel (CIA 5) para vinho tinto e branco	55

Artigo

Figura 1 – Perfil eletroforético pós-diálise de AcM IgG anti-OTA produzido durante adaptação no meio H-SFM em SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio- Gel de Poliacrilamida, corado com nitrato de prata). Padrão:	
---	--

	marcador de proteína (Bench Mark™ protein Ladder, Invitrogen, USA).....	68
Figura 2	– Perfil do título de AcM IgG anti-OTA produzido por Hibridoma OTA.1 em cultivo em meio 100% H-SFM determinado por i-ELISA	70
Figura 3	– Padronização de ic-ELISA: determinação da diluição de conjugado OTA-BSA e de título de AcM IgG anti-OTA.....	71
Figura 4	– Reação de acoplamento de AffiGel 10 com um ligante contendo grupos amino livres.....	73
Figura 5	– Coluna de imunoafinidade baseada em suporte ativado Affi-Gel-10 empregando AcM IgG anti-OTA.1	74
Figura 6	– Perfil de atividade anti-OTA nas etapas de confecção de CIA 5	76

Artigo

Figure 1	– Matrix interference in ic-ELISA for OTA determination of RE wine pool (Isabel, Bordeaux, Cabernet Sauvignon and Merlot) RO pool (Bordeaux and Isabel) and WH pool (Chardonnay, Muscat and Niagara), in which OTA was not detected by HPLC. The dried residue after extraction corresponding of 5 ml of each pool was suspended in 1 ml and diluted 1:2; 1:5; 1:10, 1:20 e 1:50- fold in methanol: PBST 1:9, v/v prior to ic-ELISA	88
Figure 2	– Matrix interference of RE wine pool (Isabel, Bordeaux, Cabernet Sauvignon and Merlot) RO pool (Burgundy and Isabel) and WH pool (Chardonnay, Muscat and Niagara) on OTA determination by HPLC. A: pool RE wine; B: pool RO wine; C: pool WH wine; D: OTA standard (10 ng ml ⁻¹). The dried residue, corresponding to 5 ml of negative matrix for OTA, was suspended in 200 µL of acetonitrile/water/acetic acid (99:99:2).....	88
Figure 3	– Standard curve for OTA detection by ic-ELISA. Circles represent the mean binding from seven standard curves performed on different days over a 1-month period. Bars represent standard deviations. The detection limit was 0.17 ng.ml ⁻¹ for RE wine, 0.15 ng.ml ⁻¹ for RO wine and 0.14 ng.ml ⁻¹ for WH wine, which was the minimum concentration over (12.78, 11.19 and 9.76 %, for RE, RO and WH	

	wine) inhibition (mean minus 3-fold SD of 0 ng ml ⁻¹ OTA) detected by ic-ELISA (Iijima <i>et al.</i> , 1996)	90
Figure 4	– HPLC and ic-ELISA correlation for OTA determination in positive red and white wine samples (n=14). x and y axis correspond to OTA concentration (ng ml ⁻¹) determined independently by ic-ELISA and HPLC, respectively. Correlation coefficient (0.975) was calculated by linear regression equation ($y = 0.0642x + 1.2590$)	95
 Artigo		
Figura 1	– Coluna de imunoafinidade baseada em suporte ativado Affi-Gel-10 empregando AcM IgG anti-OTA.1	107
Figura 2	– CIA comercial	107
Figura 3	– Correlação entre CIA comercial e CIA Affi-Gel 10 na determinação de OTA de amostras de vinho tinto e vinho branco, naturalmente contaminadas. Os eixos x e y correspondem à concentração de OTA (ng/mL) determinadas independentemente pela utilização de CIA comercial e CIA 5 na etapa de limpeza e concentração de OTA para análise em CLAE. O coeficiente de correlação $R = 0,9539$ foi calculado pela equação de regressão linear $Y = 0,03431x + 0,88191$	109

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
Ac-Ag	Anticorpo- Antígeno
AcM	Anticorpo Monoclonal
Acp	Anticorpo Policlonal
AFB₁	Aflatoxina B ₁
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina de soro bovino
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CIA	Coluna de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
CZE-LIF	Eletroforese Capilar com Fluorescência Induzida por Laser
DAS	Diacetociscirpenol
DMSO	Dimetil-sulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FPIAs	Imunoensaio de Fluorescência Polarizada
HCL	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
H-SFM	Meio <i>Hybridoma-SFM (serum free medium)</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ic-ELISA	<i>Indirect competitive- ELISA</i> competitivo indireto
i- ELISA	<i>Indirect ELISA- ELISA</i> indireto
GC-IR	Cromatografia Gasosa-Espectroscopia Infravermelho
IgG	Imunoglobulina G
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants</i>
MIP	<i>Molecular Imprinted Polymer</i>

OIV	Organização Internacional do Vinho
OTα	Ocratoxina α
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
OVA	Ovoalbumina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio – Tween
QCM	<i>Quartz Crystal Microbalance</i>
PTWI	Limite tolerável provisório de ingestão semanal
SFB	Soro fetal bovino
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TMB	3, 3', 5, 5'- Tetrametilbenzidine
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	VITIVINICULTURA NO BRASIL	22
3.2	FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS E OCRATOXINA EM UVAS E VINHOS	24
3.3	OCRATOXINAS	28
3.4	METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE OTA	32
3.5	COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE PARA LIMPEZA DE AMOSTRA E CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINA	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	IMUNOQUÍMICA APLICADA NA PRODUÇÃO DE INSUMO ESTRATÉGICO: ANTICORPO MONOCLONAL DE ALTA ESPECIFICIDADE PARA A DETECÇÃO DE OCRATOXINA	56
5.2	SINGLE-LABORATORY VALIDATION OF ELISA BASED ON MONOCLONAL ANTIBODY FOR PRACTICAL OCHRATOXIN DETECTION IN WINE	56
5.3	COLUNA DE IMUNOAFINIDADE BASEADA EM AFFI-GEL IMOBILIZADO COM ANTI-OCRATOXINA MONOCLONAL PARA MONITORAMENTO DE OTA EM VINHO	56
	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira tem se destacado como atividade importante para a sustentabilidade da propriedade de pequeno porte e na geração de emprego, em empresas de processamento, seja de suco, geléia, vinho, passas, entre outros. Por outro lado, o país tem buscado expandir a exportação de vinhos, incentivando o aprimoramento enológico, com foco no controle de qualidade e segurança desde o início de cadeia produtiva.

O consumo de vinho no Brasil situa-se em torno de dois litros per capita/ano, enquanto nos principais países consumidores como Espanha, Itália, França e Portugal, o consumo aproxima-se a 50 litros. A tendência atual de aumento no consumo no Brasil se deve à divulgação de benefícios à saúde, oriundos de compostos com atividade antioxidante presentes em vinho tinto.

A crescente produção de vinho fino nos últimos anos é evidente, com a comercialização de 50 milhões de litros em 2003, em relação à 78 milhões em 2007. Uma redução de 4,08% na produção, interrompendo a tendência crescente, ocorreu em 2009, em função a fatores climáticos desfavoráveis associados à crise mundial. A cifra correspondeu à redução na produção de 4,98%, 28,56% e 15,79% de uva, vinho de mesa e fino, respectivamente, no estado do Rio Grande do Sul, responsável por 90% da produção. O fato contrasta à tendência positiva na comercialização, com aumento de 19,53% no consumo de suco, vinho, e espumante em 14,57% em relação ao ano de 2008, além do estímulo de visitantes especialistas estrangeiros e destaques em revistas internacionais (MELLO, 2009, a).

O agronegócio globalizado exige uma legislação adequada visando à saúde dos consumidores. A produção de bom vinho requer uva de ótima qualidade, com controle desde característica de videira a fitossanidade. Bagas danificadas por insetos, aves ou por outros fungos, bem como irrigação excessiva e chuva na colheita, favorecem a proliferação de fungos de podridão, com destaque a *Aspergillus* secção *Nigri*. Determinadas estirpes da secção produzem a Ocratoxina A (OTA), micotoxina nefrotóxica, teratogênica, citotóxica, neurotóxica, imunossupressora e possivelmente carcinogênica para humano.

Embora cereais contribuam com 40 a 50% de ingestão de OTA na União Européia, o vinho é a segunda maior fonte (10 a 12%) com limite máximo permitido de 2 µg/L para vinho, suco, néctar e mosto de uva (COMMISSION OF THE EUROPEAN

COMMUNITIES, 2006). No Brasil, a implantação de limite máximo para OTA em vinho, suco, néctar e mosto de uva está em pauta, iniciada pela consulta pública, nº 100 de 21 de dezembro de 2009 (BRASIL, 2009), sendo inicialmente sugerido limite de 10 µg/L, com segunda proposta em discussão de 2 µg/L.

Contínuo monitoramento de OTA requer métodos analíticos confiáveis, sensíveis, específicos, rápidos, reprodutíveis e de fácil execução, com destaque aos métodos químicos clássicos. Métodos imunológicos destacam-se pela aplicabilidade no monitoramento rápido, mas são sujeitos a interferência de componentes de matriz alimentar. Os compostos fenólicos funcionais, com destaque a flavonóides e não-flavonóides de importância organoléptica perante cor, adstringência, e amargor no vinho, podem também constituir em interferentes na análise imunológica. A eliminação de interferentes é fundamental na etapa de limpeza, sendo os principais métodos empregados, a clarificação, partição líquido-líquido, extração em fase sólida, ou através de coluna de imunoafinidade (CIA).

O rígido controle de qualidade na cadeia produtiva de vinho, aliada à dependência de *kits* importados, estimulam à produção de imunorreagente nacional. O trabalho visa contribuir com o desenvolvimento de imunotécnica baseada em anticorpo monoclonal (AcM) IgG anti-OTA desde o cultivo celular empregando hibridoma OTA.1, padronização e validação de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) e CIA destinados à avaliação de OTA em vinho tinto, rosado e branco.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir imunorreagente baseado em anticorpo monoclonal IgG anti-ocratoxina A para padronização de ic-ELISA e coluna de imunoafinidade, visando aplicação no controle de qualidade de vinho.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar e expandir hibridoma linhagem OTA.1 em meio sintético para produção de anticorpo monoclonal (AcM) específico para OTA;
- Purificar a partir de cultivo de hibridoma OTA.1 AcM IgG anti-OTA com alta especificidade e afinidade para utilização em imunoenaios;
- Padronizar e validar intralaboratorialmente ic-ELISA para análise de OTA em e vinho.
- Desenvolver coluna de imunoafinidade (CIA) baseada em suporte Affi-Gel 10 e AcM IgG anti-OTA.1 para limpeza de extrato proveniente de vinho.
- Padronizar e validar intralaboratorialmente CIA Affi-Gel quanto à eficiência na limpeza e recuperação de OTA de amostras de vinho, bem como quanto à possibilidade de reuso em comparação com CIA comercial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 VITIVINICULTURA NO BRASIL

A viticultura brasileira iniciou-se com os colonizadores portugueses, no século XVI, com a introdução de primeiras videiras na Capitania de São Vicente, atual Estado de São Paulo. A produção de vinhos como atividade comercial ocorreu somente no final do século XIX e de XX com a imigração italiana. As videiras européias (*Vitis vinifera*), não obtiveram expressão no início da vitivinicultura comercial devido à incidência de doença fúngica. As variedades *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina* de origem americana, mais resistentes, constituíram a base do desenvolvimento da vitivinicultura brasileira, com destaque às cultivares Isabel e Niágara, que são destinadas à produção de vinho de mesa. Atualmente, as variedades de *vinífera* tintas predominante no Brasil são: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Tannat e Pinot Noir. A partir da década de 90, vinhos de maior qualidade passaram a ser produzidos. A região do país que mais se desenvolveu na produção de vinhos foi a serra gaúcha, no estado do Rio Grande do Sul, denominada hoje de Vale dos Vinhedos. (IBRAVIN, 2008).

A viticultura brasileira ocupa área de aproximadamente 77 mil hectares, estabelecidos desde o extremo sul do país, latitude de 30°, até regiões próximas à linha do Equador, latitude de 5°, resultando em diversidade ambiental, com pólos de viticultura com característica de região temperada a pólo tropical. A produção de uvas atinge 1,2 milhões de toneladas/ano, com 45% destinado à elaboração de vinho (77% vinhos de mesa, 13% vinhos finos), suco (9%) e outros derivados (1%), em relação à 55% comercializado como uvas de mesa, cifra compondo metade da uva nacional destinada á elaboração de vinho, suco de uva e derivados. O principal produto de exportação, em volume, é o suco de uva, com cerca, de 15% do total destinado ao mercado externo (IBRAVIN, 2008).

Na maioria dos estados brasileiros, houve redução na produção de uvas em 2009, interrompendo a tendência crescente dos últimos anos. A crise mundial refletiu fortemente na produção de uvas de mesa, sendo que alguns produtores abandonaram parte dos vinhedos. Além disso, fatores climáticos desfavoráveis resultaram em menor produção. A maior redução ocorreu no Estado de Minas Gerais com 14,13%, seguido por São Paulo com

7,79% e pela Bahia com 7,15%. O Rio Grande do Sul, principal Estado produtor, responsável por aproximadamente 90%, de uvas e vinhos do país apresentou redução de 4,98%. Em contraste, os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Pernambuco, apresentaram aumento tanto na área plantada como na área colhida. Santa Catarina e Paraná apresentaram acréscimo na produção de uvas de 16,00% e 0,57%, respectivamente. Redução da área plantada em torno de 1,15% e da área colhida de 0,41% (IBGE, 2010) ocorreu principalmente nos Estados da Bahia, São Paulo e Minas Gerais.

O suco de uva apresentou aumento de 3,39% em relação à queda dos vinhos de mesa em 28,56%, indicando que uvas destinadas à elaboração de vinhos de mesa ou suco dividem o mesmo mercado. Os vinhos finos tiveram sua produção reduzida em 15,79% em relação ao ano a 2008 (MELLO, 2009, a).

No cenário internacional, em 2007 a vitivinicultura brasileira ocupou o 17º lugar em área cultivada, 19º em produção, 11º em quantidade e o 7º em valor das exportações e o 10º maior exportador de suco de uvas. Outrossim, exportação de uva de mesa correspondendo a 54.560 toneladas, não apresentaram bom desempenho em 2009, sendo 33,65% a menos que 2008 em decorrência à crise mundial, desencadeando desestímulo e abandono de parreirais do Nordeste Brasileiro e perda devido a chuva no Vale do São Francisco. A exportação de suco de uva reduziu em 11,52% em quantidade e 16,82% no valor, se comparado ao ano 2008. Não obstante, o vinho de mesa apresentou em volume exportado 25,51 milhões de litros, 146,5% superior ao ano de 2008, embora com redução no valor relativo, já que a maioria referiu-se a vinho de mesa e de vinhos finos de baixo valor agregado, contemplados pelo Prêmio de Escoamento da Produção do Governo Federal – PEP (MELLO, 2009, b).

Embora o Brasil tenha apresentado balanço desfavorável perante produtos vitivinícolas em 2009, o aumento na comercialização vem se confirmando, com a visita de especialistas internacionais interessados em estabelecer relações comerciais. O recente destaque na revista norte-americana *Wine Spectator*, uma das mais prestigiadas publicações de vinhos do mundo, consagrou a qualidade do vinho brasileiro, como o sabor de fruta fresca, leveza com a presença moderada de álcool aliada a alta qualidade dos espumantes de bom preço (UVIBRA- União Brasileira de Vitivinicultura, 2010).

A globalização exige competitividade, inclusive o próprio consumidor brasileiro tem cada vez exigido informações sobre o vinho perante qualidade, procedência de variedade de uva, safra, estimulando a agregação de novos elementos de qualidade aos vinhos

nacionais. Uma iniciativa implementou indicação geográfica, que constitui procedimento de proteção, visando principalmente, a distinção da origem de um produto através da identificação da área de produção. O produto incorpora competitividade no mercado interno e internacional, já que o certificado projeta imagem associada às virtudes e à tipificação, promovendo uma garantia institucional da qualidade, reputação e identidade (TONIETTO, 2003). No Brasil, a implementação de indicação geográfica tornou-se concreta pela Lei nº 9.279 - "Lei de Propriedade Industrial", de 14 de maio de 1996, com primeira certificação de Indicação Geográfica aprovada em 2002 para os Vinhos Finos do Vale dos Vinhedos no Rio Grande do Sul (BRASIL, 1996).

3.2 FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS E OCRATOXINA EM UVAS E VINHOS

A preocupação com fungos em vinhedo estava relacionada à doença, a exemplo de oídio (*Uncinula necator*), míldio (*Plasmopara viticola*), antracnose (*Elsinoe ampelina*), escoriose (*Phomopsis viticola*), podridão cinzenta da uva (*Botrytis cinerea*), podridão da uva madura (*Glomerella cingulata*), podridão amarga (*Melanconium fuligineum*), fusariose (*Fusarium oxysporu*) e doenças da madeira (*Eutypa* spp, *Botryosphaeria* spp., *Sphaeropsis* spp., e *Phomopsis viticola*) que pela colonização sistemática ocasiona podridão descendente.

Mas estudos foram apontando que espécies principalmente de *Aspergillus* estavam relacionadas á produção de OTA nas uvas (GARRIDO; SÔNEGO, 2003). Zimmerli e DicK (1996) detectaram a presença de OTA em suco de uvas e em vinhos em níveis de 0,003 a 0,451 ng/mL, ao pesquisar vários alimentos, entre os quais cerveja, vinho tinto, rosado e branco, suco de uva e café. Vários fatores são necessários para o acúmulo desta micotoxina em vinho, destacando-se a composição da micoflora da uva, estágio de maturação das bagas, condições climáticas e técnicas de fabricação do vinho (DELAGE *et al.*,2003).

O principal gênero ocratoxigênico envolvido é o *Aspergillus*, com destaque ao agregado *A. niger* e *A. carbonarius* pertencentes à secção *Nigri*, causadores de podridão preta, que sendo micoflora do solo, infectam a vinha. O aumento de incidência de *Aspergillus* ocorre com a irrigação excessiva no período de maturação, ou chuva abundante na colheita, favorecendo o rompimento de bagas. Cachos de uva sem contaminação aparente também

podem conter OTA, embora bolor negro visível sugira maiores níveis de contaminação (LEONG *et al.*, 2006 a).

Uma pesquisa em safra consecutiva de 3 anos (2004-2006) em oito vinhedos da Itália, mostrou ampla variabilidade nos níveis de OTA entre os anos particularmente na safra de 2005 com maior contaminação por *Aspergillus* secção *Nigri* devido à maior umidade. A infecção de uva por oportunistas como *Botrytis cinerea*, causa ferimento na película de baga, favorecendo a colonização de *Aspergillus* spp (COZZI *et al.*, 2007). LEONG *et al.* (2004) observaram o aumento da incidência de *Botrytis* em uvas cultivadas na Austrália, e consequentemente a de *Aspergillus* secção *Nigri* em ano chuvoso.

No estágio de maturação de uva, o agregado *A. niger* é o principal grupo e a incidência de agregado *A. carbonarius* é cerca de duas a três vezes menor (BATTILANI *et al.*, 2006). Todavia, *A. carbonarius* apresenta maior proporção de cepas ocratoxigênicas e em níveis mais elevados se comparadas ao agregado *A. niger* (ABARCA *et al.*, 2001; BATTILANI; PIETRI 2002; ROSA *et al.*, 2002; MAGNOLI *et al.*, 2003; BELLÍ *et al.*, 2004; OLIVERI *et al.*, 2008; KHOURY *et al.*, 2008). *A. carbonarius* é espécie invasiva, capaz de penetrar nas bagas, mesmo se a película esteja intacta e, as uvas podem ser susceptíveis à infecção desde o estágio inicial da maturação (BATTILANI; PIETRI, 2002). Outras cepas de *Aspergillus* spp. já tem sido detectadas em baixa frequência a exemplo de secção *Circumdati* (ROSA *et al.*, 2002; BATTILANI *et al.*, 2003; BAU *et al.*, 2005).

Serra (2005) realizando pesquisa em Portugal para caracterizar fungos ocratoxigênicos nas regiões produtoras de uvas durante três anos (2001 a 2003) detectou com maior frequência o agregado *A. niger* e *A. carbonarius*. Todas as cepas de *A. carbonarius* produziram a OTA em relação à apenas 4% do agregado *A. niger*, estabelecendo que *A. carbonarius* seja a principal espécie produtora de OTA em uva portuguesa. Quanto a estágio da maturação de uva, OTA foi detectada desde os estágios iniciais até à vindima, sendo a produção favorecida nos estágios iniciais de maturação. Em uva de vindima aparentemente normal, o teor de OTA não excedeu 0,12 ng/mL, contrastando ao cacho com podridão visível por *A. carbonarius* com teor de 7,5 ng/mL, enfatizando principal medida preventiva que deve evitar o processamento de uvas podres.

Fatores climáticos também afetam o desenvolvimento de fungo e a produção de OTA (BATTILANI *et al.*, 2006). A temperatura ótima para o crescimento de *A. carbonarius* situa-se entre 30 e 35°C, com atividade de água (Aa) ideal entre 0,93-0,987, não ocorrendo crescimento em temperaturas inferiores a 15°C (ESTEBAN *et al.*, 2004;

MITCHELL *et al.*, 2004). O agregado *A. niger* apresenta condições ótimas de crescimento entre 35 e 37°C e Aa de 0,93 a 0,98 e a produção de OTA entre 20 e 25°C com Aa de 0,93 a 0,98 (ESTEBAN *et al.*, 2004). A temperatura acima de 30°C no mês precedente a colheita de uvas, favorece a multiplicação de *Aspergillus* secção *Nigri* capazes de sobrevivência sob armazenagem a 0°C por 30 dias. O aumento da umidade e temperatura também favorece *A. carbonarius*, bem como a produção de OTA (BELLÍ *et al.*, 2005; BELLÍ *et al.*, 2007).

Produção de OTA durante o processo de vinificação é pouco provável que aconteça, mas a transferência de uva para vinho e subprodutos ocorre, sendo este processo estudado. O processamento de vinho tinto, rosado e branco apresenta diferenças peculiares. O vinho tinto resulta da fermentação de pele das bagas juntamente com o mosto após o esmagamento, mas também é nessa fase que ocorre maior extração de OTA, se a uva estiver contaminada. O vinho rosado apresenta essa etapa bem mais curta, enquanto que para o vinho branco, as peles de bagas são separadas de mosto após o esmagamento ocorrendo pouco contato deste com a massa. (FERNANDES *et al.*, 2003). Battilani *et al.* (2003) detectaram um aumento de OTA de cerca de 20%, durante a maceração das bagas enquanto na fermentação ocorreu maior remoção. Bejaoui *et al.* (2004) demonstraram que leveduras utilizadas na fermentação são capazes de adsorver rapidamente a OTA.

Leong *et al.* (2006 b) relataram que 24% da concentração de OTA originalmente presentes na uva esmagada transferiram facilmente para o vinho. Estudo de microvinificação *in vitro* foi realizado por Solfrizzo *et al.* (2007, visando avaliar níveis de OTA em cada etapa de vinificação empregando uva italiana variedades Negroamaro e Primitivo naturalmente contaminada. Procedendo a análise das amostras de mosto, bagaços de uva, borras e vinho centrifugados para remoção de biomassa, apenas 4% de OTA presente em uva permaneceram no vinho, enquanto que 95% seja mantido em polpas prensadas (98% na pele e 2% nas sementes) e 1% é retido na borra.

No Brasil, Nunes (2008), realizou dois estudos de microvinificação com uvas (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Syrah) provenientes do Estado de Santa Catarina da safra de 2006, sendo um com uvas visivelmente sãs e o outro com um terço de uvas apresentando podridão. A amostragem representou todo o processo de vinificação sendo do mosto fresco, pós-fermentação alcoólica, primeira trasfega, (descuba), segunda trasfega (pós-fermentação malolática) e terceira trasfega. Detectou OTA no mosto dos dois estudos, sendo 0,27 µg/Kg para mosto de uvas sãs 2,28 µg/Kg para mosto de uvas com podridão. Durante o processo de vinificação a partir de uvas com podridão obteve 83,8% de remoção de OTA,

permanecendo OTA residual de 0,37 µg/Kg, enquanto na vinificação de uvas boas obteve remoção superior a 81,5%. Conclui que a fermentação alcoólica foi a etapa mais significativa na redução dos níveis de OTA, em torno de 50%, enfatizando a necessidade de controle no processo de vinificação principalmente no mosto fresco e após a fermentação alcoólica.

A contaminação de vinho por OTA tem sido motivo de estudo a nível mundial. Vinhos do Sul e regiões mais quentes da Europa apresentaram 72,3%, com contaminação média de 0,64 µg/kg na análise de 635 amostras, enquanto os vinhos da região norte apresentaram 50,3%, com contaminação média de 0,18 µg/kg, analisando 835 amostras. Os vinhos produzidos no Sul da Itália, geralmente apresentam ocorrência e níveis de contaminação maior em relação aos vinhos produzidos nas regiões Norte e Central da Itália. A ocorrência de OTA tem sido maior em vinho tinto (78,4%), com maior nível de contaminação de 7,63 µg/kg, seguido pelo rosado e branco (VISCONTI *et al.*, 1999; PIETRI *et al.*, 2001; BRERA *et al.*, 2005; BACALONI *et al.*, 2005). Otteneder e Majerus (2000) também observaram maior teor de OTA em vinho tinto, se comparado com branco devido ao maior tempo de contato entre peles das bagas e suco de uva durante a fase de maceração.

Ospital *et al.*, (1998) apud Visconti *et al.*, (2008), encontraram OTA em 29 amostras com concentração entre 0,01 a 0,27 ng/mL na França, enquanto em Portugal, um inquérito de 340 amostras de vinho revelou presença em 69 amostras (20%), sendo que três apresentaram as concentrações mais altas: 0,5 µg/L (vinho do Porto), 1,0 e 2,1 µg/L (vinhos de mesa) (RATOLA *et al.*, 2004). Vinhos comercializados na Espanha apresentaram 73% de contaminação para vinho tinto de mesa (BURDASPAL; LEGARDA, 1999). Em estudos posteriores, 51,5% das amostras estavam contaminadas, sendo a maior concentração de 15,25 ng/mL em vinho de mesa (HERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

Em relação ao vinho americano (EUA), Soleas *et al.* (2001) analisando 71 amostras de vinho tinto e 40 de branco constataram que apenas oito amostras de vinho tinto excederam 0,05 ng/ml. Os mesmos autores avaliaram vinhos comercializados no Canadá e detectaram OTA em 16,6% de 580 amostras de vinho tinto e em 3,9% de 362 amostras de vinho branco. Shephard *et al.* (2003) detectaram OTA em 15 amostras de vinho branco com níveis entre 0,04 e 0,33 e média de 0,16 ng/mL e em nove de vinho tinto, com níveis de 0,07 a 0,39 e média de 0,24 ng/ml na África do Sul.

Rosa *et al.* (2004) analisando vinho tinto, rosado e branco, suco e polpa congelada, de origem brasileira, chilena e argentina, obtidos em mercados no Rio de Janeiro, apontou a presença de OTA em 25% das 64 amostras de suco de uva e polpas congeladas,

sendo o teor médio de 0,037 ng/mL, com concentração máxima de 0,10 ng/mL. A concentração média detectada no vinho foi de 0,034 ng/mL com 28,75% de positividade em 80 amostras analisadas. Destes, 38% consistiram de vinho tinto com nível médio de contaminação de 0,037 ng/mL. O vinho branco continha nível acima de 0,026 ng/mL em 17,75% de amostras analisadas.

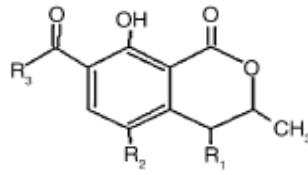
Entre poucos dados referentes à contaminação de uva e vinho na América Latina, Shundo *et al.* (2006) analisaram 101 amostras de supermercados e lojas especializadas na cidade de São Paulo, constituídas de 29 amostras de vinho tinto e 38 de suco de uva brasileiras e de 34 amostras de vinho importadas (Argentina, Chile, Uruguai, França, Itália, Portugal, Espanha e África do Sul). Todas as amostras de suco foram negativas sendo que OTA foi detectada em nove amostras de vinho nacional entre nível de 0,10 a 1,33 ng/mL, enquanto que 18 importados apresentaram nível entre 0,03 a 0,32 ng/mL.

Considerando que a contaminação por OTA esteja associada à cadeia produtiva do vinho, melhorias nas práticas vitivinícolas são requisitos básicos a redução (JORGENSEN, 2005; OIV, 2005). Concomitantemente, a disponibilidade de métodos rápidos deve ser universal para a gestão do perigo ao longo do processamento de vinho (VISCONTI; GIROLAMO, 2005).

3.3 OCRATOXINAS

Ocratoxinas são metabólitos secundários pertencentes ao grupo de micotoxinas produzidas principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo a ocratoxina A (OTA) reportada primeiramente em *Aspergillus ochraceus* na África do Sul (VAN DER MERWE *et al.*, 1965).

OTA é uma dihidroisocumarina ligada à L-fenilalanina na posição 7-carbonila (7-[L-β-fenilalanil carbonil] carboxil-5-cloro-8 hidróxi-3,4 diidro-3R metil isocumarina) (figura 1) com massa molecular de 403,82 dalton (Da). Com polaridade média, é solúvel em solventes orgânicos polares e solução aquosa bicarbonatada, mas fracamente solúvel em água (VALENTA *et al.*, 1998).



Ochratoxins	R1	R2	R3
OTA	H	Cl	-NH-CH(COOH)-CH ₂ - Phenyl
OTB	H	H	-NH-CH(COOH)-CH ₂ - Phenyl
OTC	H	Cl	-NH-CH(COOC ₂ H ₅)-CH ₂ -Phenyl
4-hydroxyochratoxin A	OH	Cl	-NH-CH(COOH)-C ₂ H- Phenyl
OT α	H	Cl	-OH

Figura 1 – Estruturas de ocratoxinas e seus análogos.

Fonte: Kawamura *et al.* (1989); Ringot *et al.* (2006).

O grupo de ocratoxinas compõe-se de análogos denominados ocratoxina A, B, C, α , β , metiléster de OT α , 4-hidroxi-OTA entre outros, apresentando cromóforo fluorescente a 335nm (XIAO *et al.*, 1995b; HARRIS; MANTLE, 2001; KAWAMURA *et al.*, 1989). A atividade tóxica da OTA é dada pelo caráter isocumarínico e grupo carbonil da molécula (XIAO *et al.*, 1996).

Apresenta grande estabilidade à alta temperatura e acidez decorrente dos processos de extração, torrefação, fermentação, cozimento, bem como em soluções acoólicas (BLANC *et al.*, 1998; VALENTA, 1998; VARGA *et al.*, 2000). É estável também em tolueno/ácido acético (99:1, v/v) por oito semanas a 25 - 40°C e, por seis meses a -18 - 4°C, mas em solução de HCl 2,0M por 16 hs ocorre hidrólise da ligação amida, originando OTA α (VALENTA, 1998). Sendo ácido fraco, dissocia-se em soluções básicas liberando íons negativos, capazes de interagir com adsorventes positivos. A carboxila e fenol da sua estrutura também são reativos. O grupo fenol adsorve em superfície negativa através de pontes de hidrogênio, ou através de transferência de carga e a carboxila do resíduo de fenilalanina é o maior responsável pela adsorção em adsorventes hidrofóbicos e carregados positivamente como sílica-gel, caseinato de potássio e carvão ativado (CASTELLARI *et al.*, 2001).

Entre alimentos implicados em contaminação citam-se cereais representando 40-50 % de ingestão total (MOLINIÉ *et al.*, 2005; JUAN *et al.*, 2008), arroz (TANAKA, 2007, NGUYEN *et al.*, 2007), arroz orgânico (GONZÁLEZ *et al.*, 2006), silage de milho (RICHARD *et al.*, 2007), azeitona (GHITAKOU *et al.*, 2006), produtos cárneos

(TOSCANI *et al.*, 2007), *blue cheese* (DALL'ASTA *et al.*, 2008), pães (ZINEDINE *et al.*, 2007), pão orgânico (GONZÁLEZ-OSNAYA *et al.*, 2007), pão de milho (JUAN *et al.*, 2007), especiarias como pimenta, páprika (GORYACHEVA *et al.*, 2006; ZINEDINE *et al.*, 2006; ALMELA *et al.*, 2007), alcaçuz e derivados (ARIÑO *et al.*, 2007), amendoim (MAGNOLI *et al.*, 2007), cerveja e vinho (MATEO *et al.*, 2007), cacau, frutas secas, uvas (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006), chás, sucos de fruta e café (FAO, 2006; MATRELLA *et al.*, 2006).

As legislações em diferentes países definem o limite máximo para OTA em $\mu\text{g}/\text{kg}$ variando de 5 para cereais crus, 3 para derivados de cereais, 10 para frutas secas, 5 a 20 para café verde, 5 para café torrado, 10 para café instantâneo, 2 para vinho/suco de uva e 0,5 para alimento infantil/dietético (EUROPEAN COMMISSION, 2005; FAO, 2006). Em relação a vinho, no Brasil a Lei no 7.678/1988 do Ministério da Agricultura regulamentada pelo Decreto no 99.066/1990 regularizou a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva no país (BRASIL, 1990), porém, não previu parâmetros quanto ao perfil microbiológico e limites para micotoxinas. Assim, em dezembro de 2009 foi iniciado através de consulta pública, processo de implantação de Regulamento Técnico sobre limite máximo para micotoxinas em alimentos, sendo sugerido inicialmente limite de $10 \mu\text{g}/\text{L}$ para OTA em vinho e suco de uva, com uma segunda proposta em discussão para $2 \mu\text{g}/\text{L}$.

Em relação aos efeitos toxicológicos de OTA, destacam-se: nefrotóxico (SAUVANT *et al.*, 2005), teratogênico, citotóxico, imunotóxico, genotóxico, neurotóxico, imunossupressor e a *International Agency for Reserch on Câncer* (IARC) classificou como carcinogênico para animais e possível carcinógeno para humano incluindo a substância no grupo 2B (IARC, 1993; KAMP *et al.*, 2005, SAVA *et al.*, 2006-a). Em todas as espécies de mamíferos avaliadas, o rim é o principal alvo para a toxicidade da OTA. Além da Nefropatia Endêmica dos Balcãs, elevada exposição à OTA pode também estar associada à falha renal e desenvolvimento de tumores no trato urinário humano (PFOHL-LESZKOWICZ *et al.*, 2004; CASTEGNARO *et al.*, 2006). Sava *et al.* (2006-b) associaram OTA com parkinsonismo devido a *stress* oxidativo e danos ao DNA cerebral decorrentes da depleção de dopamina estriatal e diminuição de tirosina hidroxilase.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA, 2001) estabeleceu um limite tolerável provisório de ingestão semanal (PTWI) em $100\text{ng}/\text{kg}$ de peso corpóreo (BERG, 2003). Embora os níveis de OTA em alimentos sejam geralmente baixos, ingestão simultânea de diferentes alimentos e bebidas contaminados, pode fornecer uma quantidade total próximo ao limite tolerável.

A absorção de OTA está relacionada aos valores de pKa, de 4,4 para o grupo carboxílico e de 7,0-7,3 para o grupo 8-hidroxila, sendo que a primeira absorção ocorre no estômago, e em seguida no intestino. Parece ocorrer absorção passiva de OTA através da membrana lipídica do trato gastrointestinal, principalmente no duodeno e jejuno, na sua forma não ionizada ou parcialmente ionizada. Na corrente sanguínea, OTA liga-se a proteínas, principalmente albumina e ao nível celular causa inibição de respiração mitocondrial pela depleção de síntese de ATP, aumento na peroxidação lipídica, redução na síntese protéica e diminuição da homeostase do cálcio (XIAO *et al.*, 1995,b).

São propostos dois mecanismos para a inibição de síntese protéica: inibição da síntese de fenilalanina-tRNA sintetase e fenilalanina hidroxilase, devido ao fato de OTA ser um análogo estrutural de aminoácidos, podendo entrar em todos os sistemas metabólicos. Assim, interrompendo a síntese protéica, pode prejudicar a atividade de diversas enzimas celulares, principalmente do fosfoenolpiruvato carboxicinase, relacionado à gliconeogênese (KONRAD; KÖSCHENTHALES, 1997).

OTA aumenta a peroxidação lipídica possivelmente estimulando a dependência de NADPH e de ascorbato no processo de peroxidação, nos microsomas, tendo como cofator Fe^{+3} . O complexo OTA- Fe^{+3} poderá ser formado, favorecendo a redução do Fe^{+3} na presença do sistema redutase NADPH-citocromo P450. O complexo OTA- Fe^{+2} resultante produz radicais hidroxila, provocando peroxidação lipídica nas membranas celulares (SOYÖZ *et al.*, 2004). Assim, afeta a permeabilidade da membrana ao Ca^{+2} prejudicando a homeostase culminando em entrada excessiva, podendo alterar todas as funções celulares que estão relacionadas à concentração do Ca^{+2} .

Existe também evidência sobre o envolvimento de OTA na formação de adutos. Experimentos com marcadores radioativos- ^{32}P - *postlabeling*- demonstraram que a dose de OTA e o tempo de permanência no organismo influenciam a formação de adutos. Segundo Pfohl-Leskowicz e Manderville (2007) após cinco dias de administração de OTA, todos os adutos desapareceram do fígado e baço, enquanto alguns permaneceram nos rins por 16 dias.

OTA é relativamente estável no sangue humano e sua meia-vida pode atingir cerca de 35 dias. A eliminação é lenta, devido à reabsorção e circulação entero-hepática e extensa ligação a proteínas séricas. Em todas as espécies, o *clearance* plasmático depende de excreção urinária e fecal e a contribuição relativa de cada uma é influenciada por via de administração, dose, grau de ligação com as proteínas do plasma e pela circulação

enterohepática. Em camundongo é de 1-2 dias, em suíno de 3-5, em rato de 2-5 e em macaco de 22 dias (CREPPY, 2002), sendo também excretada no leite (RINGOT *et al.*, 2006).

No fígado e rim, principais órgãos de biotransformação, são formados intermediários reativos, contribuindo na genotoxicidade e mutagenicidade (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Em todas as espécies analisadas, OTA é hidrolisada a Ocratoxina α (OT α), principalmente pela microflora bacteriana no intestino. Nos túbulos renais OTA é excretada através de proteínas aniônicas, e reabsorvida nos túbulos proximais, o que atrasa sua eliminação e favorece acúmulo no próprio rim e outros tecidos (RINGOT *et al.*, 2006; PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007).

Em 2002, foi feito um estudo para estabelecer a exposição diária da população europeia à OTA (MIRAGLIA; BRERA, 2002). Foram analisados resultados de ocorrência de OTA em diversos alimentos, dados de padrões de consumo alimentar, ocorrência de OTA em fluidos biológicos humanos e ingestão de OTA por bebês através do leite materno. A exposição mais elevada foi verificada no Reino Unido, de 3,55 ng/kg peso corporal por dia, concentração, abaixo do limite recomendado.

3.4 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE OTA

As etapas que envolvem a análise de micotoxinas são: amostragem, limpeza, extração e concentração, detecção, separação e quantificação. Sendo que as micotoxinas geralmente estão presentes em baixas concentrações, a eficiência dos métodos analíticos está relacionada à limpeza da amostra, processo este associado às propriedades físicas e químicas do analito. Várias técnicas como clarificação, partição líquido-líquido, colunas de extração em fase sólida (sílica, octadecilsilil, fenilsilil, florisil e imunoafinidade) (GONZÁLEZ-PEÑAS *et al.*, 2004) são disponíveis. Exemplos: colunas 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). Ênfase tem sido dada à produção de mini-coluna capaz de atingir nível de separação em apenas uma etapa cromatográfica.

A limpeza de amostras contendo OTA pode ser realizada através da separação líquido-líquido utilizando bicarbonato de sódio ou por extração em fase sólida

(SPE) estando a amostra em solução aquosa (VALENTA, 1998). Colunas de imunoafinidade baseadas em AcM foram desenvolvidas para substituir a tradicional fase sólida de limpeza. Este método associado à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite altas recuperações e limite de detecção mais baixo a partir de amostras complexas (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006). OTA pode ser também detectada/quantificada por cromatografia em camada delgada (CCD), CLAE associada à espectrometria de massas (LC/MS), cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa-espectroscopia infravermelho (GC-IR) (SOLEAS *et al.*, 2001; PITTET & ROYER, 2002; MEDINA *et al.*, 2005). Eletroforese capilar com fluorescência induzida por laser (CZE-LIF) após limpeza em colunas de sílica e imunoafinidade também constitui em alternativa (GILBERT; ANKALAM, 2002; PETTERSSON; ABERG, 2003; REINSCH *et al.*, 2005; VISCONTI; GIROLAMO, 2005; BASCARÁN *et al.*, 2007).

Segundo *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC *International*), a metodologia recomendada para análise quantitativa de OTA é a CLAE (AOAC, 1995; SYDENHAM; SHEPHARD, 1996; GILBERT; ANKLAM, 2002), que permite separação eficiente de compostos químicos e biológicos utilizando coluna preenchida com diferentes modalidades de sílica, acopladas a fase móvel eluída sob alta pressão (GUIMARÃES; COLLINS, 1993; SYDENHAM; SHEPHARD, 1996). Todavia, exige equipamento de alto custo, reagentes puros, treinamento e tempo de execução considerável (GILBERT; ANKLAM, 2002, ONO *et al.*, 2007).

CCD é técnica de baixo custo, baseada em mecanismo de adsorção líquido-sólido, sendo que a separação ocorre pela diferença de afinidade dos componentes pela fase estacionária. O perfil cromatográfico possibilita a análise de múltiplos compostos pela visualização de cor, fluorescência, fator de retenção do analito, entre outros (VALENTA, 1998; VENTURA *et al.*, 2005). Porém apresenta baixa sensibilidade, com limite de detecção e quantificação em torno de 5 e 10 ng/g, respectivamente, não atendendo muitas vezes a exigência de legislação (EUROPEAN COMMISSION, 2005).

Métodos imunoquímicos baseiam-se na interação específica entre antígeno (Ag) e anticorpo policlonal (AcP) ou anticorpo policlonal (AcM), os quais devem ter alta afinidade, especificidade, baixa reatividade cruzada e disponibilidade (HARLOW; LANE, 1988a; HEFLE, 1995; NAKANO; NAGATA, 2003), sendo que sua obtenção depende de antígenos imunogênicos purificados, protocolo de imunização e técnicas de purificação (NEWSOME, 1986; HEFLE, 1995; BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996). Micotoxinas são

haptenos, e se tornam imunogências quando conjugadas à proteínas carreadoras (ex. BSA-albumina de soro bovino), as quais devem ser pouco imunogências visando obter AcM e AcP altamente específicos para a micotoxina (GAZZAZ *et al.*, 1992; HEFLE, 1995; KIM *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 1995a, MORAN *et al.*, 2002).

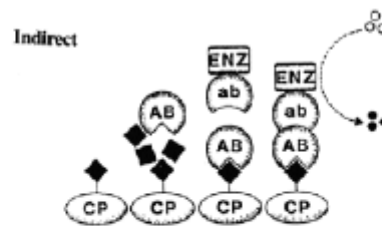
Dentre os métodos imunoquímicos destacam-se ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), imunoafinidade, imunohistoquímica, biosensores e separação imunomagnética (SCOTT; TRUCKSESS, 1997; VAN DER GAAG *et al.*, 2003; SHIM *et al.*, 2004; LOBEAU *et al.*, 2005; NGUNDI *et al.*, 2005). Exibem alta sensibilidade, facilidade de execução e dispensam etapa de limpeza/ pré-concentração de analito, resultando em detecção semi-quantitativa ideal para rápida triagem (SIBANDA *et al.*, 2002).

Inicialmente, para desenvolvimento de imunoenaios foram utilizados AcP, produzidos em coelhos ou carneiros (THIRUMALA *et al.*, 2000), mas limitações surgiram para produção em grande escala, como fornecimento de antígeno altamente purificado, manutenção de biotério e variabilidade individual do animal (WYATT, 1992), sendo superadas com o surgimento da técnica de produção de hibridomas que permite produção de AcM com alta especificidade e afinidade constante a um único epítipo e homogeneidade na estrutura, sendo produzido a partir de um único clone de linfócito B. Essa técnica consiste em imunização de camundongo com antígeno específico, retirada de células esplênicas secretoras de Ac, seleção e fusão com célula de mieloma. O hibridoma resultante, produz ilimitadamente AcM IgG quando cultivado em meio sintético de composição definida ou na cavidade peritoneal de camundongo (HARLOW; LANE, 1988a; HARLOW; LANE, 1988b; LA PINE; HILL, 2001).

Cultivo em cavidade peritoneal proporciona maiores concentrações de Ac específico, mas possui limitações como: estrutura para manutenção de animais, questões éticas no uso de animais para experimentação, presença de hemácias, fibrina e proteínas inespecíficas no líquido ascítico que dificultam a purificação (BRUCE *et al.*, 2002). Já o cultivo em meio sintético, (ex., *Hybridoma-serum free medium*) livre de soro fetal bovino (SFB) elimina esses interferentes, mas fornece menor quantidade de IgG (HARLOW; LANE, 1988 b; LIDDELL; CRYER, 1991; BRUCE *et al.*, 2002; LEGAZPI *et al.*, 2005).

O anticorpo específico produzido pode ser aplicado no desenvolvimento de imunoenaiio ELISA e uma vez que micotoxinas apresentam estrutura química e massa molecular de baixa complexidade e baixa imunogenicidade, ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) é de escolha para análise das mesmas já que requer apenas um Ac específico (CHU,

1984; HEFLE, 1995) e baseia-se na competição entre a toxina presente na amostra e àquela imobilizada na microplaca (OTA-BSA), pelo sítio de ligação do AcM (NEWSOME, 1986). A concentração de toxina na amostra é quantificada indiretamente pela reação entre o Ac anti-micotoxina adsorvido na micotoxina e Ac secundário (anti-IgG marcado com enzima), pelo desenvolvimento de cor (NEWSOME, 1986; HARADA *et al.*, 1988; HEFLE, 1995). A figura 2 mostra o esquema de ic-ELISA para análise de OTA.



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

Figura 2 – Esquema de ic-ELISA para detecção de OTA

Fonte: Pestka *et al.* (1995).

Técnicas de ELISA geralmente dispensam etapa de limpeza, mas alguns constituintes da matriz alimentar podem reagir com os Acs, afetando o sítio de ligação ao analito ou causando bloqueio estérico da ligação Ac-analito. Esta inespecificidade pode ser minimizada diluindo-se o extrato bruto ou realizando processo de limpeza (BARNÁ-VETRÓ *et al.*, 1996; PESTKA *et al.*, 1994). Com a utilização de AcM, com sítio específico para um único epítipo, resultados mais consistentes e com maior reprodutibilidade têm sido obtidos (ONO *et al.*, 2000; HEFLE, 1995).

A confiabilidade de ELISA tem sido avaliada por correlação com CLAE. Estudos comparativos vêm sendo desenvolvidos visando à implementação de imunoenensaio como ferramenta prática no diagnóstico rápido de micotoxinas (FUJII *et al.*, 2006). ic-ELISA para detecção de OTA em café verde, torrado e instantâneo apresentou limite de detecção de 3,73 µg/kg. Os coeficientes de correlação com CLAE foram: 0,98 (café verde), 0,98 (torrado) e 0,86 (instantâneo) e taxas de recuperação média no ELISA para OTA adicionada (5-70 µg/kg) de 81,53 % para café verde, 46,73 % para café torrado e 64,35 % para instantâneo,

comparado a 80,54 %; 45,91 % e 55,15 % por CLAE, respectivamente. A interferência da matriz alimentar foi minimizada pela diluição das amostras (FUJII *et al.*, 2007).

ELISA em coluna, constituída de sílica-aminopropil para adsorção de interferentes e imunossuporte contendo Ac anti-OTA, para análise semi-quantitativa de OTA em café torrado, proporcionou triagem rápida, simples e de custo acessível, apresentando *cut-off* de 6 µg/kg (LOBEAU *et al.* 2005).

Outros ensaios de ELISA para micotoxinas tem sido desenvolvidos para triagem rápida e barata, como *Lateral Flow Test*, Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (FPIAs) (SCHNEIDER *et al.*, 2004), *Flow-Through Assay* (SIBANDA *et al.*, 2002; SAEGER *et al.*, 2002) *Array Biosensors* (NGUNDI *et al.*, 2005), *Screen-printed Electrode* e outros biosensores imunquímicos competitivos baseados em ressonância de plasma de superfície (*Surface Plasmon Resonance-SPR*), microbalança de cristal de quartzo (*Quartz Crystal Microbalance -QCM*) e *Molecular imprinted polymer* (MIP) (MONACI; PALMISANO, 2004).

O *Lateral Flow Test* utiliza Ac marcados com partículas de látex na cor azul ou de ouro coloidal na cor vermelho. A amostra líquida contendo analito é colocada em contato com a membrana teste, e através de capilaridade, o líquido migra redissolvendo em certa área da membrana os Ac específicos (marcados). Enquanto o líquido contendo as partículas solubilizadas migra pela membrana, antígeno e anticorpo continuam reagindo. No campo indicador da membrana, o resultado desta reação é visualizado. A formação de cor indica a presença do Ag (resultado positivo), enquanto ausência de coloração indica ausência de Ag (resultado negativo) (SCHNEIDER *et al.*, 2004).

Já o modelo denominado *Flow Through Enzyme Immunassay*, baseia-se no mesmo princípio do ELISA competitivo direto, no qual, o Ac antimicotoxina está recobrendo a superfície de uma membrana e a micotoxina extraída vai ligar a ele. Em seguida ocorre a adição do conjugado enzima-micotoxina. A micotoxina e o conjugado enzima-micotoxina competem pelos sítios de ligação do Ac. Após lavagem, o substrato cromógeno é adicionado e reage com o conjugado enzima-micotoxina, desenvolvendo cor. Se a amostra for negativa (nível de micotoxina menor que o limite de detecção do método) haverá desenvolvimento de um ponto colorido visível no centro da membrana. Para amostra positiva, não haverá desenvolvimento de cor, sendo necessário proceder a confirmação da concentração por um método quantitativo. Estudo utilizando essa metodologia permitiu análise por detecção visual

de amostras de trigo artificialmente contaminadas com 4 µg/kg, em 15 min (SAEGER; PETEGHEM, 1999).

Imunosensores para a detecção de OTA e outras micotoxinas utilizam diferentes sistemas ópticos de detecção como elipsometria, espectroscopia (luminescência, fosforescência, fluorescência, Raman), interferometria (de luz branca, modal) e ressonância de plasma de superfície- SPR (*Surface Plasmon Resonance*). A quantificação do analito é realizada por medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes ou por sinal químico-óptico (GAUGLITZ; BRECHT, 1995). A sensibilidade, rapidez, facilidade e o custo/ efetividade destes métodos são desejáveis quando comparados aos métodos tradicionais (VALENTINI *et al.*, 2003).

O biosensor baseado em SPR tem como princípio a medida da mudança na concentração de massa na superfície de um sensor devido à ligação de moléculas. Em comprimento de onda e ângulo de incidência específico, a luz é absorvida por elétrons livres em fino filme de metal na superfície de um sensor, diminuindo a intensidade da luz refletida. O ângulo em que o fenômeno ocorre muda proporcionalmente à mudança de concentração de massa na superfície do sensor. No caso das micotoxinas as mudanças ocorrem devido à ligação entre o antígeno imobilizado (micotoxina) e o anticorpo específico adicionado à amostra (VAN DER GAAG *et al.*, 2003).

Biosensor para detecção de OTA em cereais e bebidas no formato de ELISA competitivo foi desenvolvido sendo que o limite de detecção para cereais variou entre 3,8-100 ng/g, e para café e vinho entre 7-38 ng/g. As amostras não passaram por etapa de limpeza e OTA derivatizada imobilizada competiu com a OTA da amostra (em solução) por ligação ao Ac fluorescente anti-OTA. A quantificação foi dada pela medida do sinal de fluorescência emitido na superfície condutora de ondas, sendo inversamente proporcional à concentração de OTA na amostra (NGUNDI *et al.* (2005).

No imunoensaio de fluorescência polarizada, a intensidade da polarização da luz emitida vai depender da rotação aleatória que ocorre na molécula. Quanto menor a molécula, mais rápido ela gira e menor é a polarização. Para micotoxina, esta é marcada com fluoróforo e vai competir com micotoxina livre pelo sítio específico do Ac. Na ausência de micotoxina livre, a marcada se liga ao Ac, ocorrendo formação do complexo Ac-Ag, diminuição da rotação, e aumento da polarização. O valor de fluorescência polarizada é indiretamente proporcional à concentração do analito na amostra, pois quanto mais micotoxina marcada se ligar, maior a fluorescência polarizada e menor a concentração de

micotoxina na amostra teste. A medida da polarização pode ser feita utilizando um equipamento portátil (SCHNEIDER *et al.*, 2004; MARAGOS, 2009).

Metodologias para determinação simultânea de diferentes analitos têm sido exploradas, uma vez que determinada matriz alimentar pode apresentar várias micotoxinas e mesmo com concentração individual abaixo do limite permitido, a associação pode potencializar a toxicidade. A co-ocorrência de AFB₁, OTA e ZEA foi relatada em 86% de amostras de cereais e amendoins analisadas na República de Côte d'Ivoire. Algumas amostras não continham OTA, mas AFB₁ em concentrações acima do permitido. Outras continham quantidades baixas das três micotoxinas, cuja soma pode representar alta ingestão de substâncias tóxicas (SANGARE *et al.*, 2006). Ensaio multi-micotoxinas apresentam benefícios como menor custo e tempo de análise, importantes no controle de qualidade.

CCD foi a técnica mais utilizada no passado para análise multimicotoxinas, mas devido às exigências das legislações, a sensibilidade foi restringindo seu uso dando lugar a MS. Análise de razão por CCD para triagem de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂, citrinina, diacetociscirpenol (DAS), OTA, patulina, penitrem A, esterigmatocistina, toxina T-2 (T₂) e zearalenona (ZEA) foi realizada sendo a sensibilidade menor para amostras multi-componentes. A detecção foi em µg/kg, sendo 3 para AFB₁, 80 para OTA, 330 para esterigmatocistina, 600 para patulina e 1.000 para ZEA (ROBERTS; PATTERSON, 1975). Os mesmos autores melhoraram a metodologia utilizando CCD bi-dimensional e sistema apropriado de solventes obtendo melhor sensibilidade também em nível de µg/kg, sendo para AFB₁ 0,1-0,3, OTA e esterigmatocistina (5-20), T₂ (20) e ZEA (200) (PETTERSON; ROBERTS, 1979).

Soares e Rodriguez-Amaya (1989) utilizaram CCD para pesquisar micotoxinas em 296 amostras incluindo feijão, produtos a base de milho, farinha de mandioca e arroz. Os limites de detecção foram 2, 5, 15 e 55 µg/Kg para Aflatoxinas, OTA, Esterigmatocistina e ZEA. A taxa de recuperação para amostras artificialmente contaminadas foi de 91-101% para AFB₁, 98-117% para esterigmatocistina e 96-107% para ZEA.

CLAE acoplada à MS tem se destacado na análise multi-micotoxinas. Determinação de trinta e nove micotoxinas em trigo e milho utilizando etapa única de extração (acetonitrila/água/ácido acético 79:20:1, v/v/v) seguida por CLAE acoplada a MS foi desenvolvida para análise de tricotecenos A e B, ZEA e derivados, Fumonisin, Enantinas, Alcalóides do Ergot, Ocratoxinas, Aflatoxinas e Moniliformina, com limite de detecção variando entre 0,03-220 µg/kg e duas corridas de 21 min. Foi observada interferência da matriz

de amostras de trigo artificialmente contaminadas. No ano seguinte, publicaram método para análise semi-quantitativa de oitenta e sete analitos baseado em CLAE-MS/MS, utilizando etapa única de extração com acetonitrila/água seguida de diluição do extrato bruto. O limite de detecção variou entre 0,02-225 µg/kg para todas as micotoxinas (SULYOK *et al.*, 2006; SULYOK *et al.* 2007).

Análise simultânea de trinta e três micotoxinas por CLAE-MS/MS em amendoim, pistache, trigo, milho, *cornflakes*, passas e figo foi realizada após extração por acetonitrila/água. Em única corrida de 30 min. foram analisadas: aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, OTA, DON, ZEA, T₂, toxina HT-2, alfa-zearalenol, beta-zearalenol, esterigmatocistina, CPA, ácido penicílico, fumonisinas B₁, B₂ e B₃, DAS, 3- e 15-acetial-deoxinivalenol, ergotamina, ergocornina, ergocristina, alfa-ergocriptina, citrinina, roquefortina C, fusarenona X, nivalenol, ácido micofenólico, alternariol e alternariol monometil éter. O limite de quantificação para Aflatoxinas e OTA foi 1 µg/kg, para DON 50 µg/kg e para as demais micotoxinas variou entre 10-200 µg/kg (SPANGER *et al.*, 2008).

Método simples baseado em ic-ELISA para detecção visual de OTA e AFB₁ em pimenta foi desenvolvido em coluna de 1 mL de CNBr ativada-Sepharose 4B. A coluna consistiu de uma camada para limpeza da amostra e duas imunocamadas para detecção dos analitos. A concentração de toxina presente na amostra foi avaliada por relação inversa à intensidade de cor azul desenvolvida e a análise foi realizada em 20 min para seis amostras. Os limites de detecção foram 5 µg/kg para AFB₁ e 10 µg/kg para OTA, sendo os resultados confirmados por CLAE e MS (GORYACHEVA *et al.*, 2007).

3.5 COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE PARA LIMPEZA DE AMOSTRA E CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINA

Colunas de imunoafinidade (CIA) com alta atividade específica, estabilidade e seletividade utiliza suportes sólidos constituídos de polissacarídeos como celulose, agarose, *Sepharose*, e ligantes específicos acoplados. O processo de ativação e acoplamento desses ligantes é relativamente simples, mas a instabilidade mecânica pode limitar uso em cromatografia por afinidade de alta resolução (WIMALASENA; WILSON, 1991; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; SHELVER *et al.*, 2002). Suportes de sílica

empregados em CLAE surgiram como alternativa, caracterizando-se pela alta eficiência e estabilidade mecânica em relação ao gel de *Sepharose*, permitindo modificação superficial por adição de grupo funcional, minimizando adsorção inespecífica e favorecendo acessibilidade a ligantes específicos (ex., IgG) (RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; TONHI *et al.*, 2002; JURADO *et al.*, 2002; JURADO; JARRET, 2003).

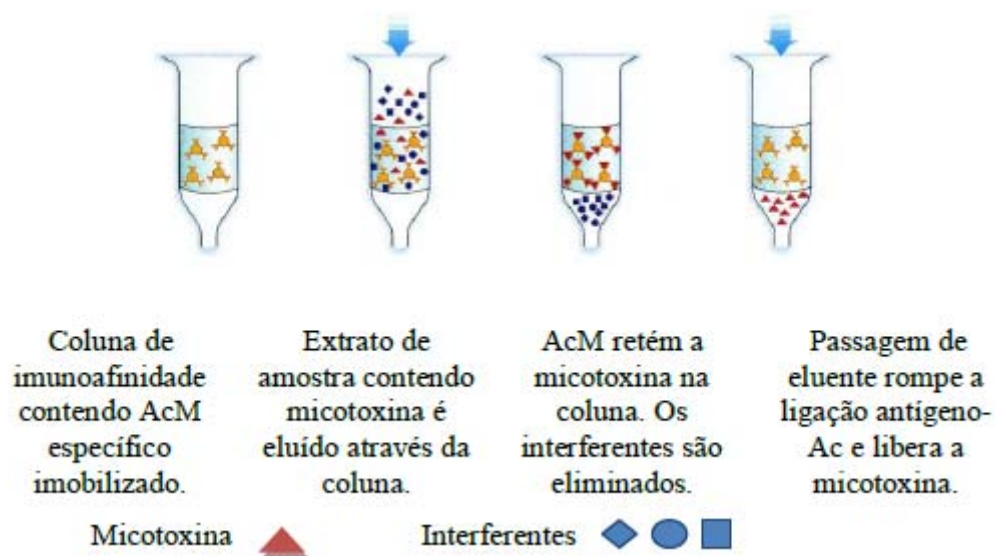


Figura 3 – Procedimento de limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade.
 Fonte: R-Biopharm Rhône Ltda, USA.

A aplicação de minicolunas preparadas com sílica, fenilsilil, alumina, carbono, aminopropil, octadecilsilil, florisil, cianopropil ou celite constituíram a base para a introdução de mini-colunas de imunoafinidade baseadas em Acs (MATEO *et al.* (2001). As colunas compõem-se de um suporte de fase sólida ativada, como *Sepharose*®-CNBr e sílicas, no qual são imobilizados os Acs específicos contra determinada micotoxina (SCOTT; TRUCKSESS, 1997; JURADO; JARRET, 2003). Na passagem do extrato da amostra pela coluna, a micotoxina liga-se ao Ac específico imobilizado sendo em seguida eluída com solvente apropriado, o que confere eficiência e aplicabilidade (figura3).

A reatividade do imunossuporte é diretamente dependente da orientação da imobilização da biomolécula (ex. IgG), bem como do método de ativação da matriz e do grupo reativo disponível no Ac 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 4) (WIMALASENA; WILSON, 1991; RUHN *et al.*, 1994; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; GERING *et al.*, 2002).

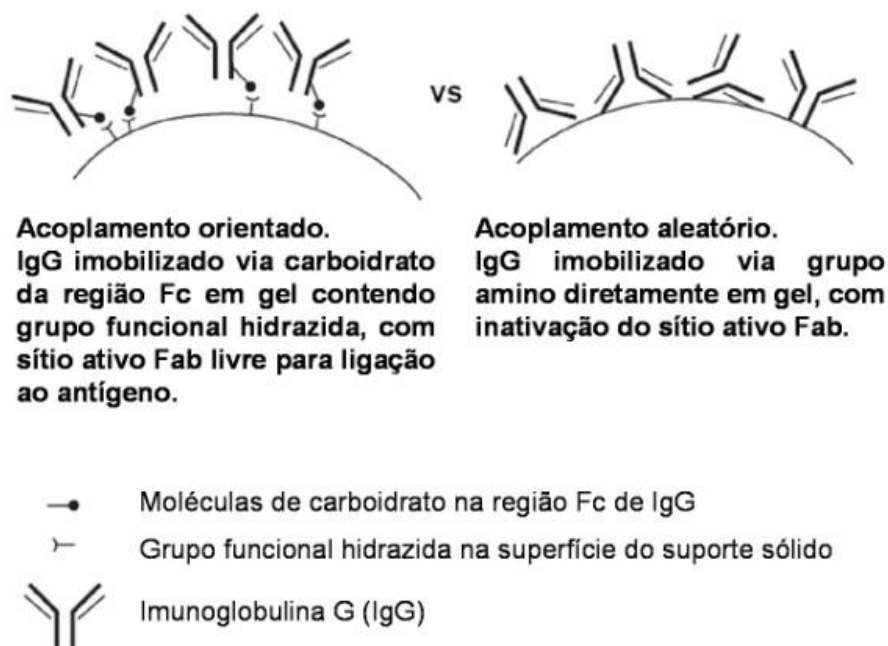


Figura 4 – Imobilização orientada e aleatória de IgG em suporte sólido.
Fonte: Bio-Rad Laboratories, USA.

CIAs apresentam como desvantagem utilização de grande quantidade de IgG e alto custo, que poderia ser minimizado por regeneração das colunas com reutilização sem perda significativa na atividade. Alguns pesquisadores sugerem a regeneração da CIA utilizando tampão fosfato salina pH 7,4, seguindo-se manutenção no mínimo de 24 horas a 4°C antes de proceder novo uso (SCOTT; TRUCKSESS, 1997; FAZEKAS; TAR, 2001; WATANABE *et al.*, 2001; KONDO *et al.*, 2002, FUJII, 2007).

Avaliação de reutilização de CIA com suporte *Formyl-Cellulofine*® ativado para microcistinas, apontou manutenção na eficiência de recuperação da toxina 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 (KONDO *et al.* 2002). Regeneração de CIA baseada em suporte sílica-hidrazida (CIA-Hz) para OTA após cinco usos consecutivos, teve recuperação diminuída de 62,87 para 29,13 % (arroz), 71,33 para 44,90 % (milho) e 54,58 para 10,23 % (café), comparada à CIA OchraTest com manutenção média de 94,82 % e 92,95 % para arroz e milho, após quatro regenerações, enquanto para café a recuperação média reduziu significativamente de 67,02 % para 13,87 %, uma vez que trata-se de matriz de composição complexa, sendo enfatizado o emprego único da coluna (FUJII, 2007).

Na análise de OTA, tem sido utilizada CIA para matrizes complexas, como café (SIBANDA *et al.*, 2002), vinho (DALL'ASTA *et al.*, 2004), cerveja (VISCONTI *et al.*, 2000), aflatoxina em ração (SHARMA; MÁRQUEZ, 2001), produtos lácteos (DRAGACCI *et al.*, 2001), alimentos infantis (STROKA *et al.*, 2001), amendoim e pàprica (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).

Colunas comerciais para a análise de OTA encontra^m-se disponíveis a exemplo de OchraTest (Vicam®); OchraPrep e Ochrascan *Easi-Extract ochratoxin* (Röhne Diagnostics®); Rida *ochratoxin A column* (R-Biopharm®) (SCOTT; TRUCKSESS, 1997; CASTELLARI *et al.*, 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Fluxograma experimental

As metodologias utilizadas no decorrer de toda pesquisa estão apresentadas em formato de fluxograma abaixo descrito. O detalhamento de etapas metodológicas consta no item Resultados e Discussão apresentado na forma de artigos a serem submetidos para publicação.

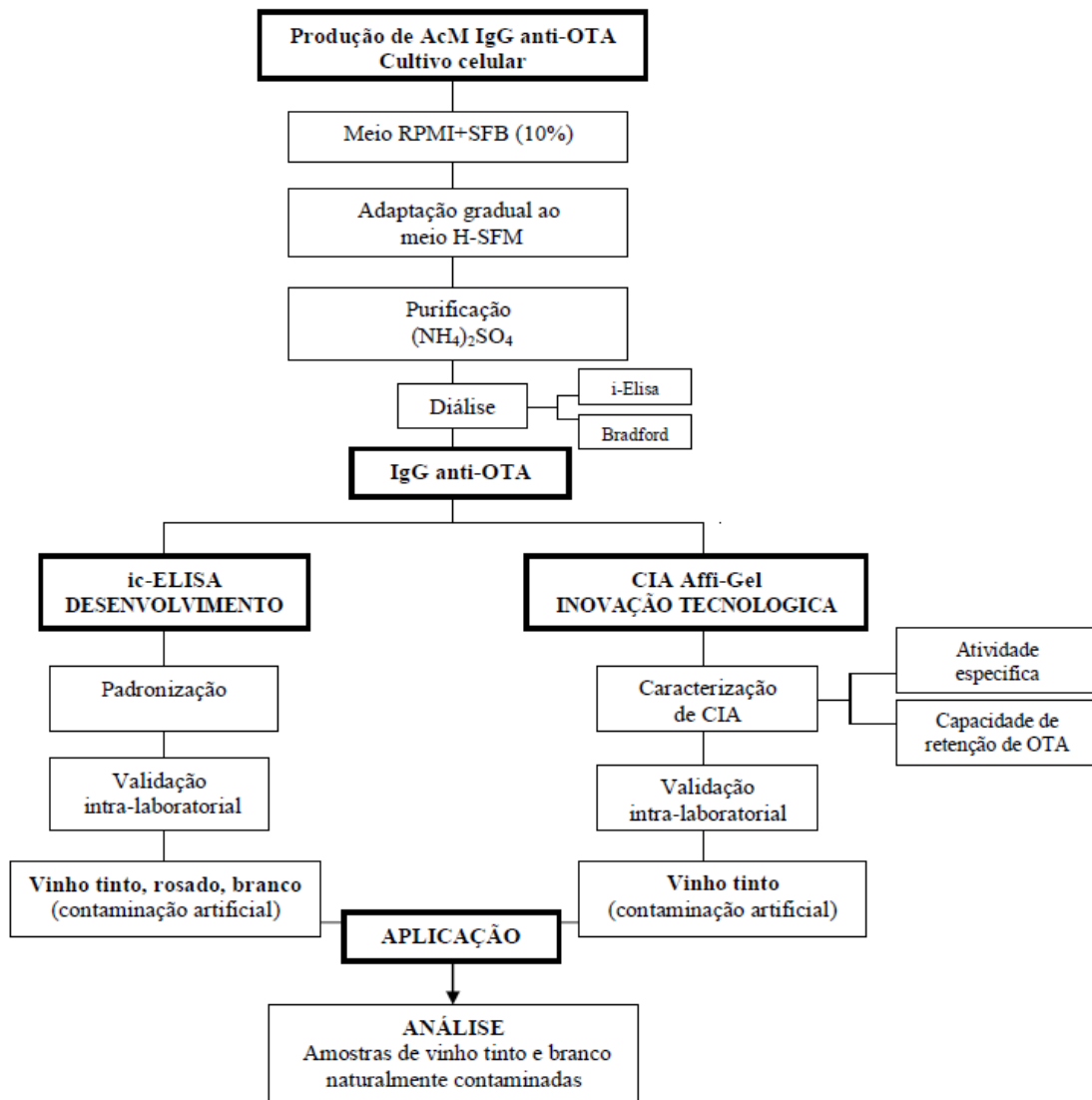


Figura 1 – Fluxograma de delineamento experimental total.

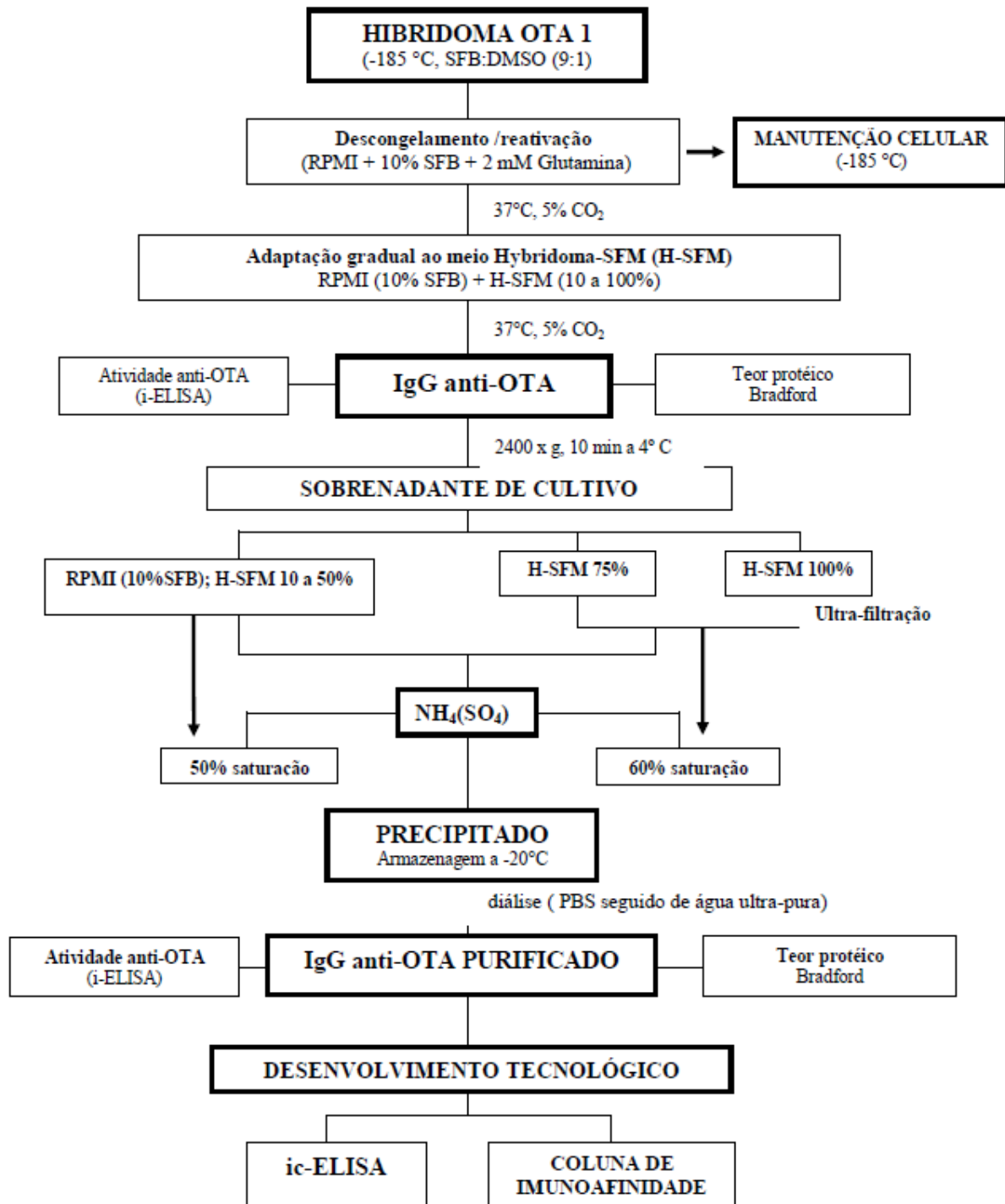


Figura 2 – Reativação, cultivo e manutenção de hibridoma OTA.1 para produção de IgG anti-OTA em meio sintético H-SFM.

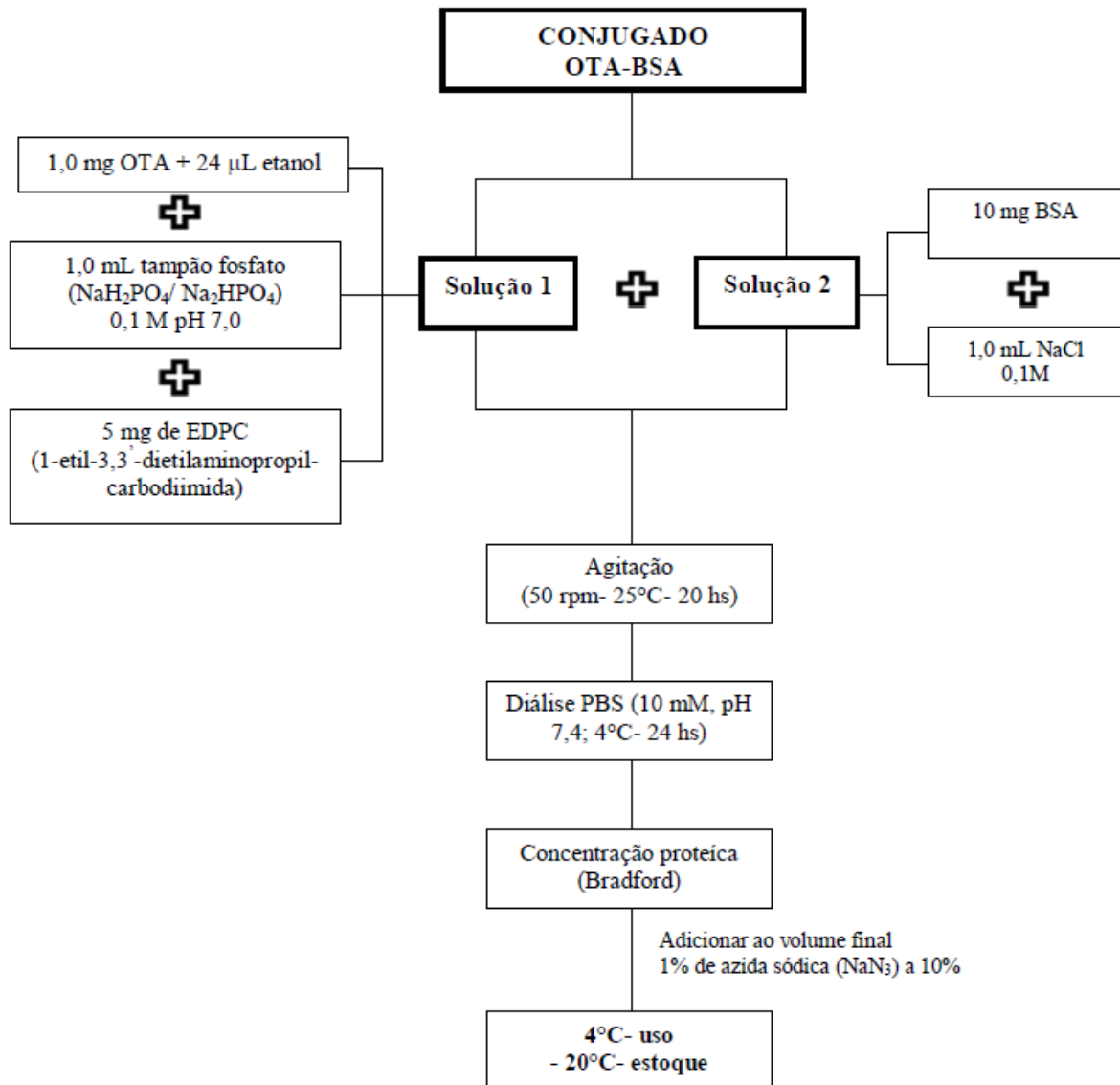


Figura 3 – Preparação de conjugado OTA-BSA

Fonte: Kawamura *et al.* (1989).

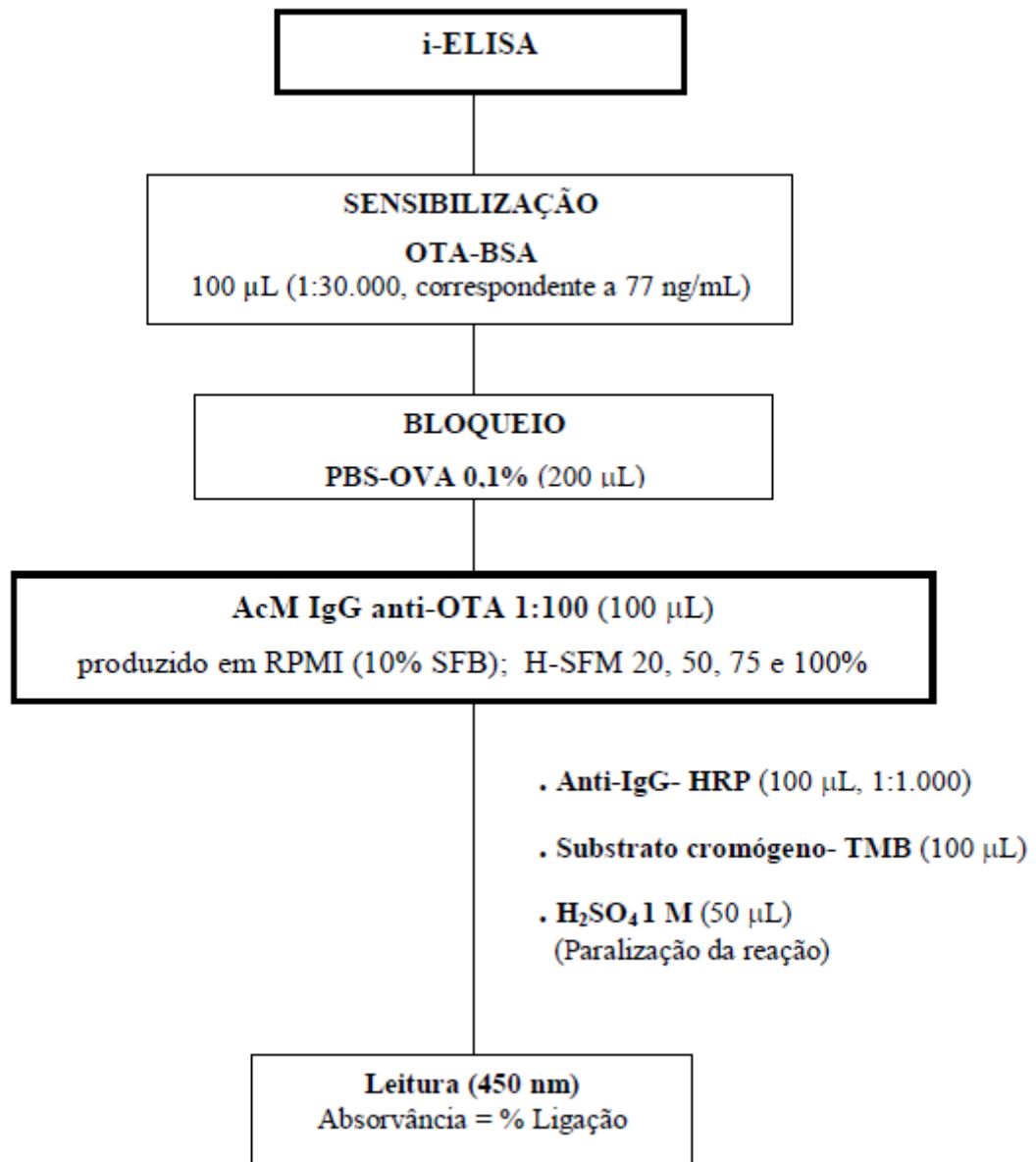


Figura 4 – Determinação de atividade de AcM IgG anti-OTA por i-ELISA
Fonte: Kawamura *et al.* (1989).

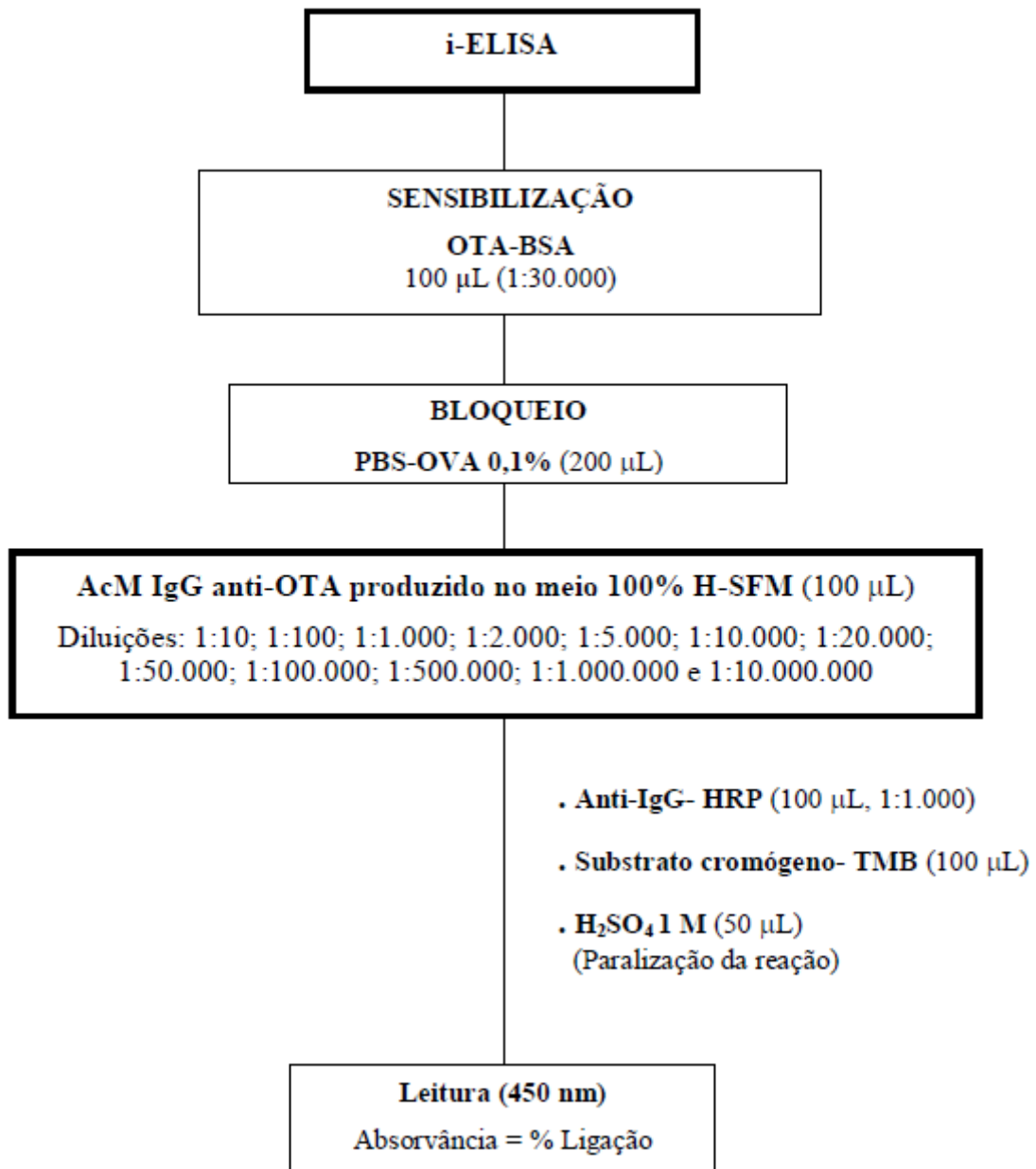


Figura 5 – Perfil do título de AcM IgG anti-OTA por i-ELISA
Fonte: Kawamura *et al.* (1989).

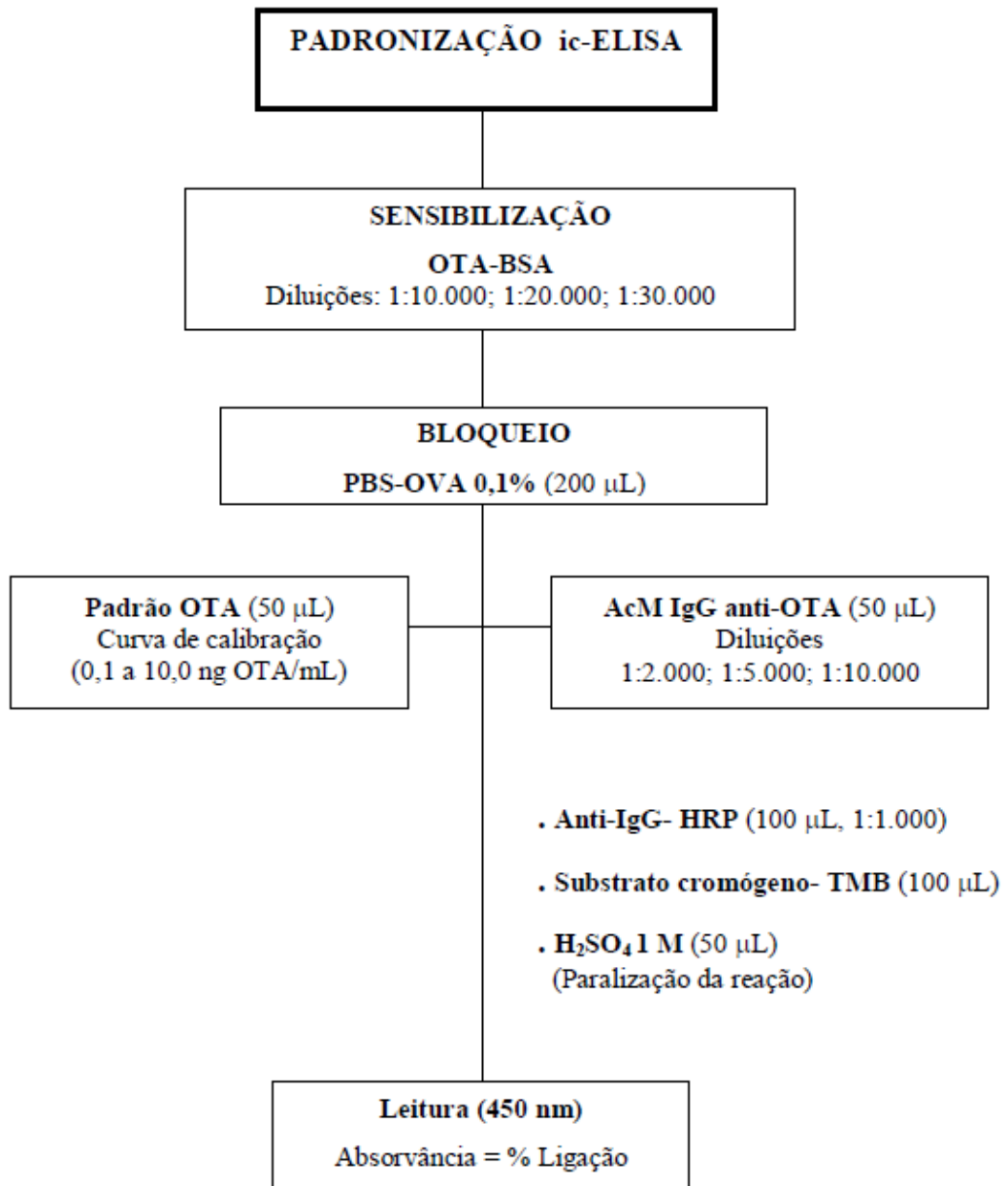


Figura 6 – Padronização de ic-ELISA: determinação de diluição ótima de conjugado OTA-BSA e de título de AcM IgG anti-OTA.

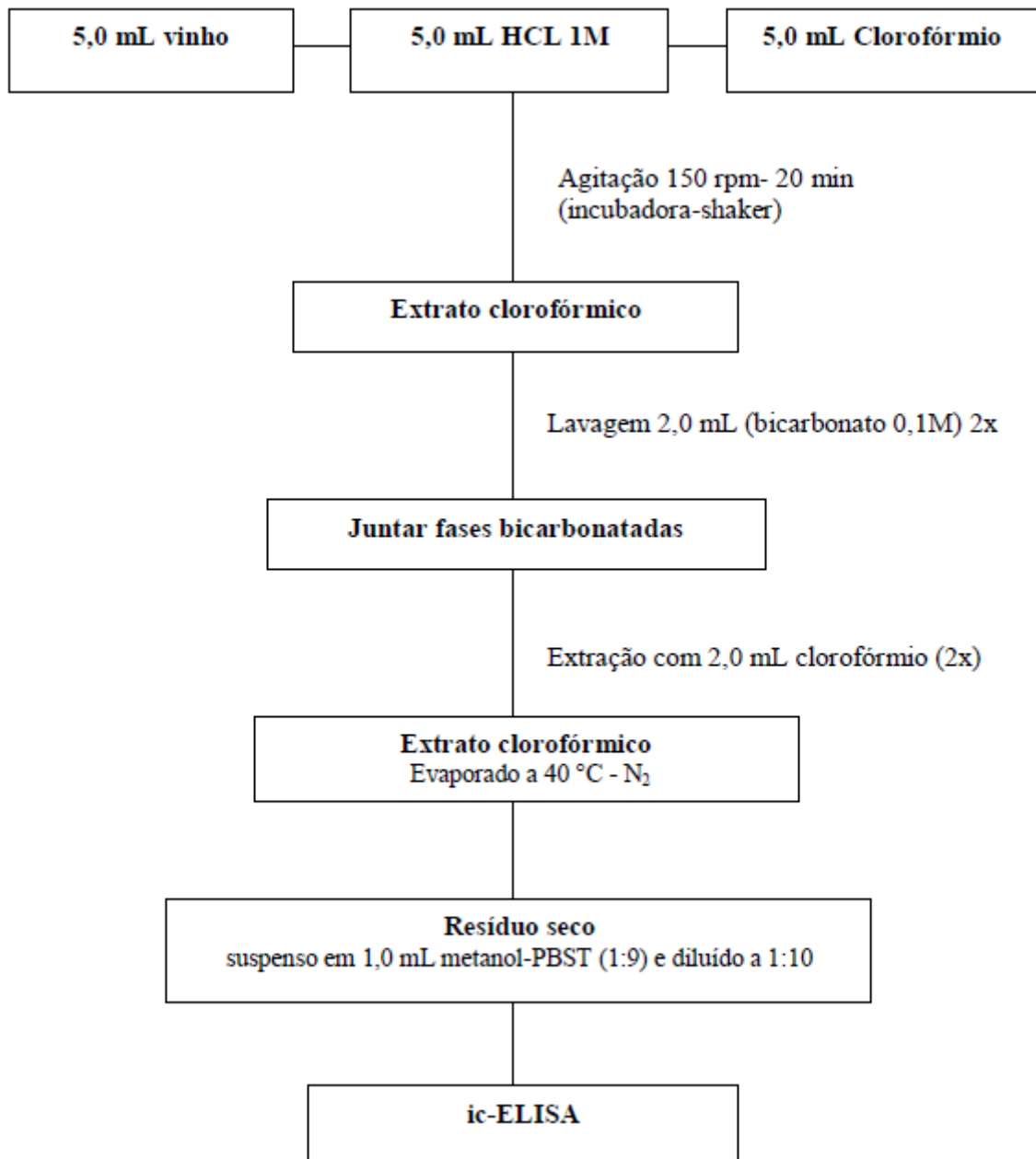


Figura 7 – Extração de OTA para análise por ic-ELISA

Fonte: Flávia *et al.* (2009).

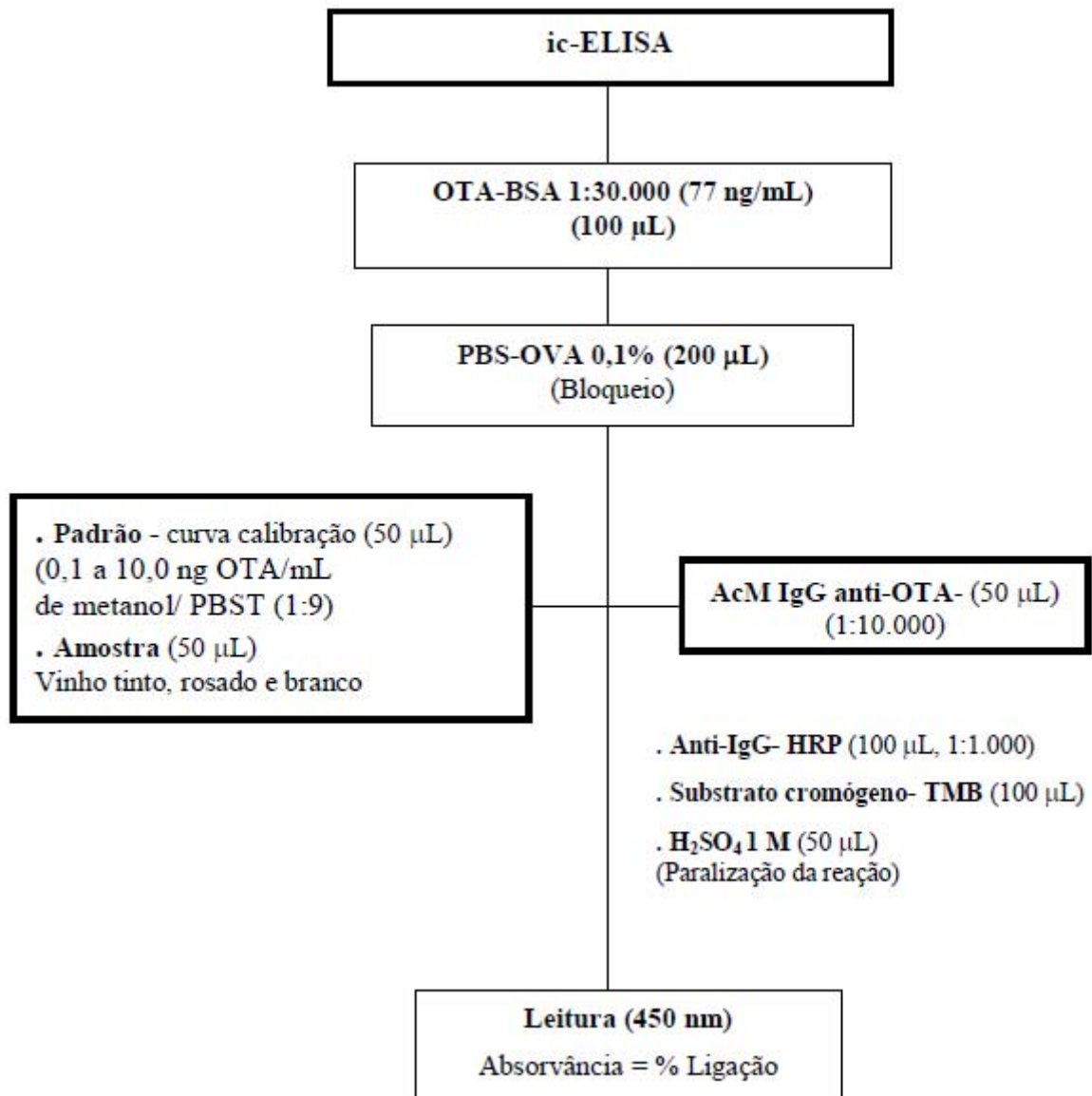


Figura 8 – Análise de OTA por ic-ELISA para vinho tinto, rosado e branco
 Fonte: Kawamura *et al.* (1989).

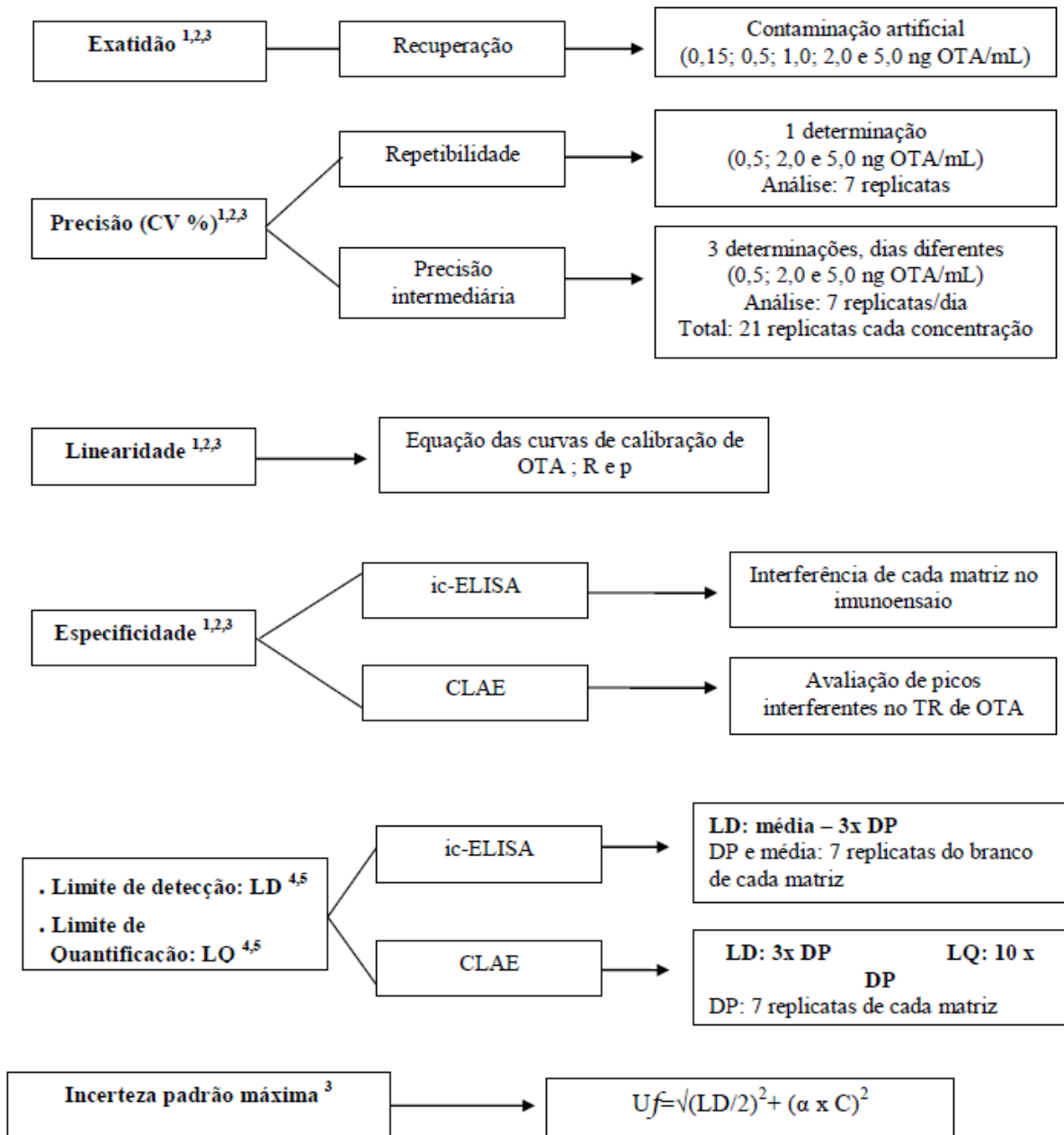


Figura 9 – Validação intra-laboratorial de ic-ELISA para análise de vinho tinto, rosado e branco.
Fonte: ¹ ANVISA (2003); ² INMETRO (2007); ³ *Commission of the European Communities*, (2006); ⁴ Soares (2006); ⁵ Iijima *et al.* (1996).

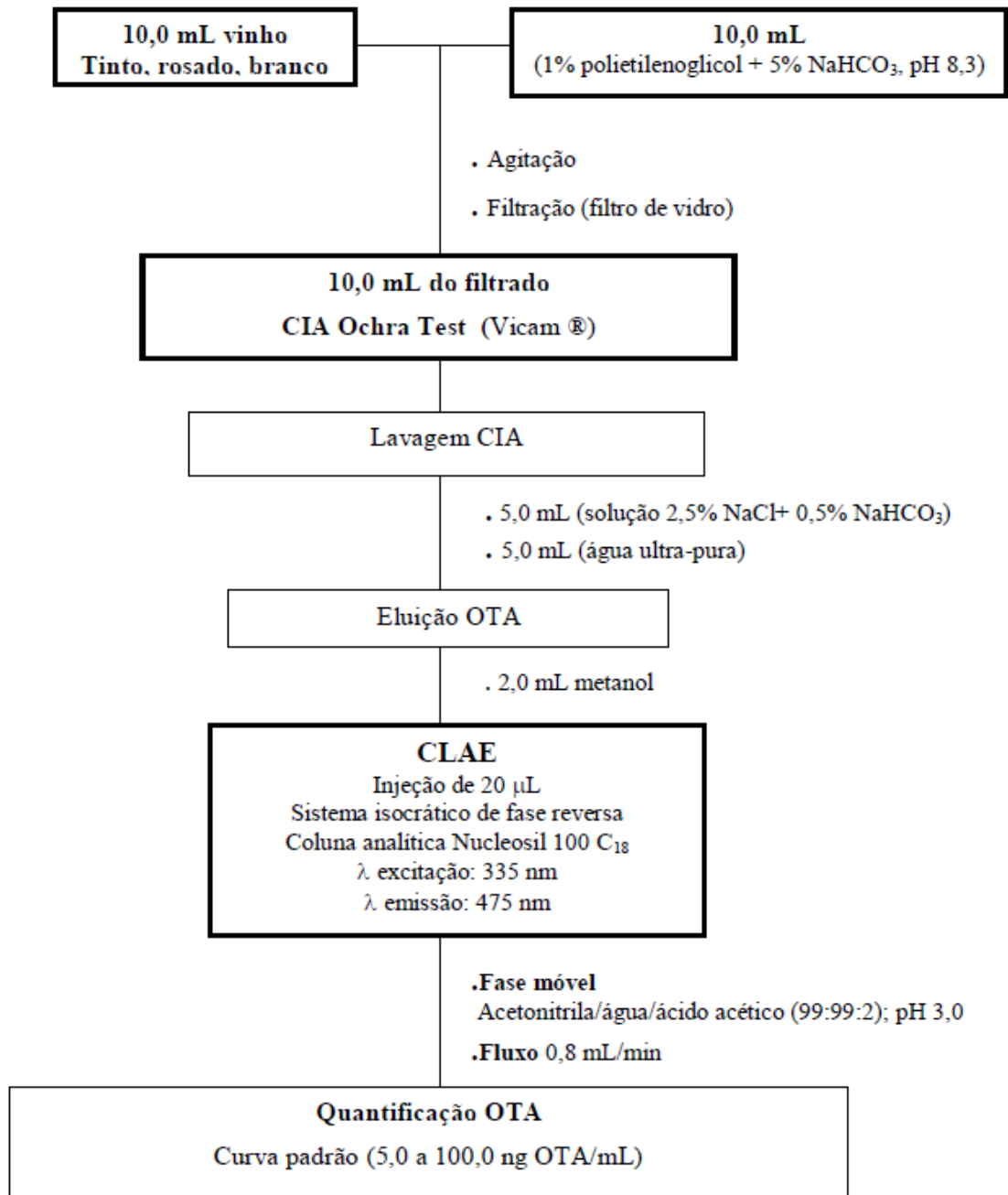


Figura 10 – Extração e análise de OTA por CLAE

Fonte: Vicam®, manual de procedimento (2005).

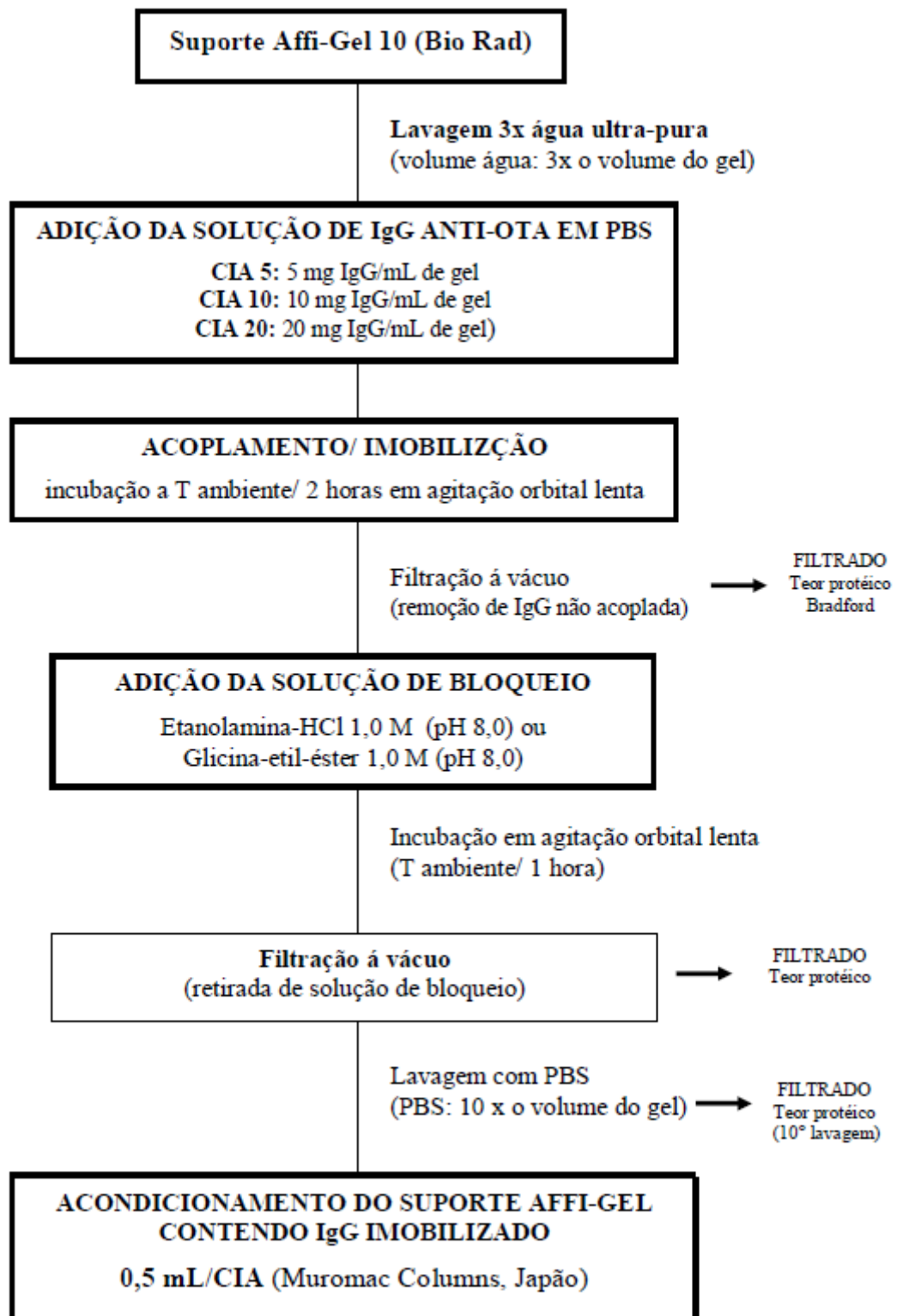


Figura 11 – Desenvolvimento de CIA Affi-Gel utilizando AcM IgG anti-OTA.

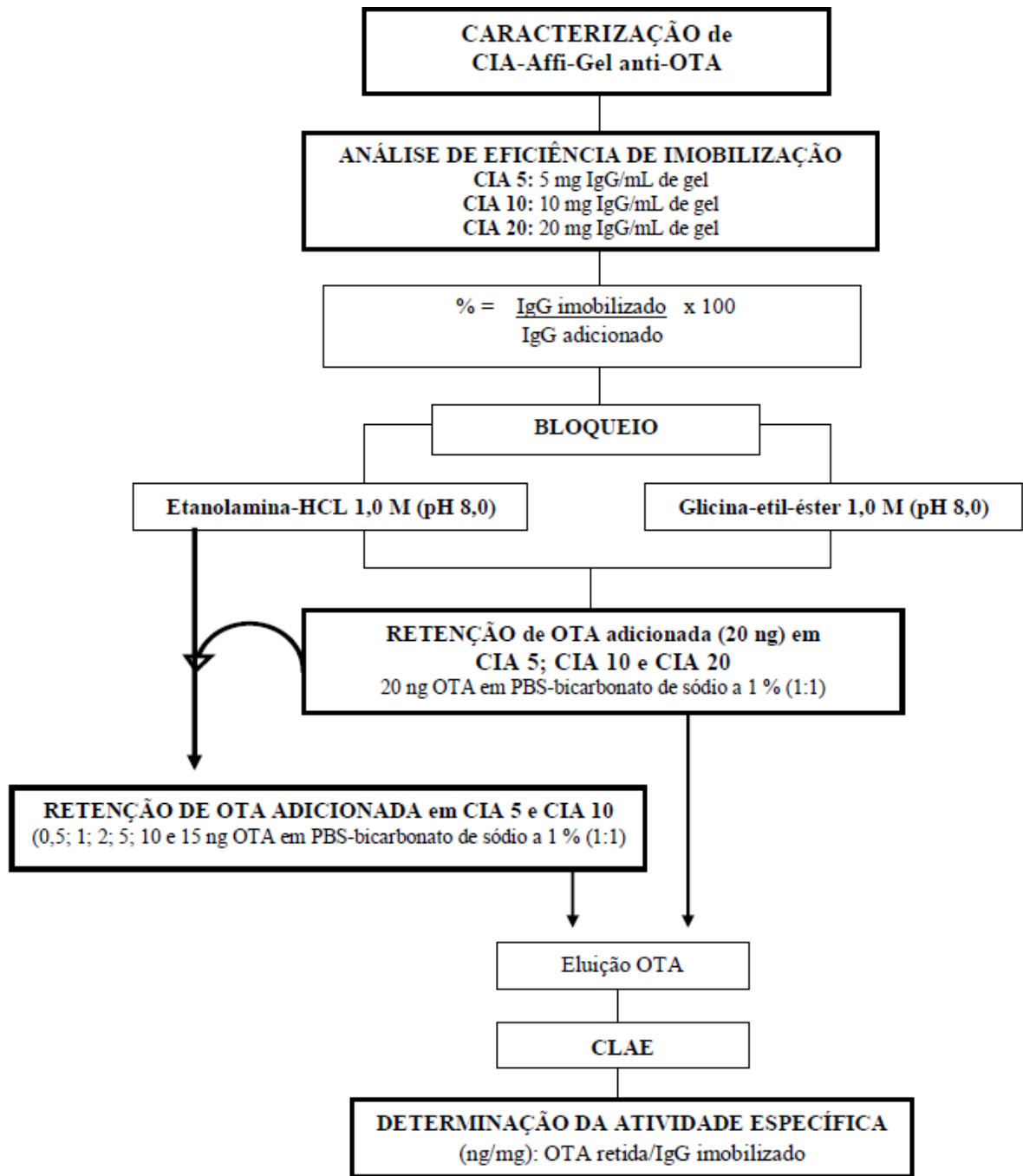


Figura 12 – Caracterização de CIA Affi-Gel desenvolvida perante eficiência de imobilização de IgG, retenção de OTA e atividade específica.

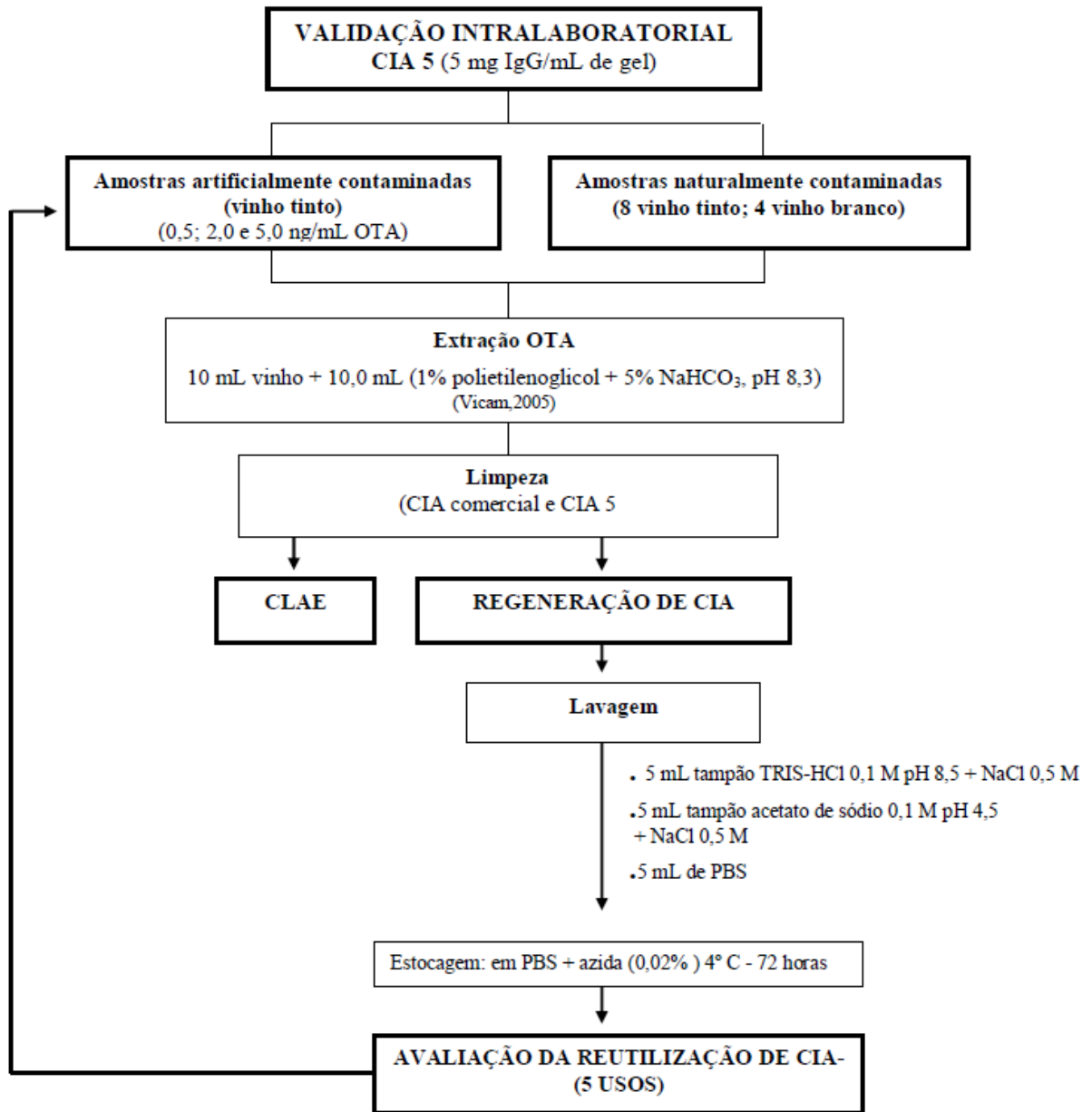


Figura 13 – Validação intralaboratorial de CIA Affi-Gel (CIA 5) para vinho tinto e branco.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

5.1 PRODUÇÃO DE INSUMO ESTRATÉGICO: ANTICORPO MONOCLONAL DE ALTA ESPECIFICIDADE PARA A DETECÇÃO DE OCRATOXINA

5.2 SINGLE-LABORATORY VALIDATION OF ELISA BASED ON MONOCLONAL ANTIBODY FOR PRACTICAL OCHRATOXIN DETECTION IN WINE

5.3 COLUNA DE IMUNOAFINIDADE BASEADA EM AFFI-GEL IMOBILIZADO COM ANTI-OCRATOXINA MONOCLONAL PARA MONITORAMENTO DE OTA EM VINHO

5.1 PRODUÇÃO DE INSUMO ESTRATÉGICO: ANTICORPO MONOCLONAL DE ALTA ESPECIFICIDADE NA DETECÇÃO DE OCRATOXINA

Resumo

Ocratoxina A (OTA) destaca-se pelo risco de exposição devido ao envolvimento em extensa variedade de alimentos, estando sob alvo de exigente legislação da Comunidade Européia. No contexto, as projeções de agronegócio brasileiro prevêem segurança alimentar entre as metas, cujo amplo monitoramento dependente de importação de kits para análise tornou-se um gargalo incontestável. Visando suprir reagente imunológico nacional, o trabalho objetiva a produção de AcM IgG anti-OTA empregando hibridoma OTA.1 em meio sintético destinado ao desenvolvimento de imuno-bioferramentas. O cultivo de hibridoma OTA.1 foi iniciado no meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, seguido de adaptação gradativa até 100% de meio H-SFM (*Hybridoma-Serum Free Medium*). A precipitação com sulfato de amônio, seguida de análise por eletroforese apontou maior pureza do AcM produzido no meio 100% H-SFM, assim como maior atividade anti-OTA, analisado por ELISA indireto (i-ELISA). Este AcM de maior pureza permitiu desenvolvimento de ic-ELISA padronizado para uso sob título de 1:10.000, acoplado ao conjugado OTA-BSA diluído a 1:30.000. Para o desenvolvimento de CIA baseada em suporte ativado Affi-Gel 10 misturou-se AcM do cultivo em 75 e 100% H-SFM (proporção 1:1), para confeccionar CIAs com 5, 10 e 20 mg de IgG/mL de gel que foram denominadas de CIA 5, 10 e 20, respectivamente. Os sítios de Affi-Gel não ligados com IgG foram capeados com etanolamina ou glicina e, o efeito avaliado perante taxa de imobilização de IgG ao gel, retenção de OTA e atividade específica de CIA desenvolvida. Não houve diferença significativa na taxa de imobilização para as CIAs capeadas com etanolamina, mas houve entre CIA 5 e 20 e entre CIA 10 e 20 capeadas com glicina ($p < 0,05$), obtendo-se 86,43 e 83,75% para CIAs 5; 85,18 e 83,83% para CIAs 10 e 88,5 e 87,93% para CIAs 20, capeadas respectivamente com etanolamina e glicina. Em relação à taxa de retenção de OTA (20 ng) pelas CIAs foram obtidas taxas de 72,08 e 70,30 % pelas CIAs 5; 76,85 e 74,23% pelas CIAs 10 e 67,20 e 56,75% pelas CIAs 20 capeadas respectivamente com etanolamina. Não foi encontrada diferença significativa entre as CIAs 5 e entre as CIAs 10, mas sim entre as CIAs 20 ($p < 0,05$), obtendo-se menor taxa de retenção pela CIA capeada com glicina. Quanto à atividade específica (ng OTA retida/mg IgG imobilizado), as CIAs 5 apresentaram maior atividade, sendo de 6,54 e 6,66, em relação às CIAs 10 que apresentaram 3,58 e 3,52 e as CIAs 20, 1,50 e 1,28 respectivamente para capeamento com etanolamina e glicina, não havendo diferença significativa entre as CIAs com mesma concentração de IgG imobilizado. Em função de maior taxa de retenção de OTA e maior atividade específica obtidos pelas CIAs 5 e 10, sugere-se que as mesmas sejam aplicadas em estudos de validação em matriz alimentar, sendo capeadas com etanolamina em virtude de menor custo. Salienta-se que o AcM produzido por hibridoma OTA.1 apresentou alta especificidade atingindo título de 1:10.000 em ic-ELISA e constitui-se em reagente promissor para emprego em bioferramentas sensíveis enfatizando a necessidade de contínuo aprimoramento na tecnologia de produção de imunoreagentes.

Palavras – chave: Anticorpo monoclonal IgG anti-OTA. ic-ELISA. Coluna de imunoafinidade.

IMMUNOCHEMISTRY APPLIED IN THE PRODUCTION OF STRATEGIC INPUT: MONOCLONAL ANTIBODY WITH HIGH SPECIFICITY FOR THE DETECTION OF OCHRATOXIN

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is noted for risk of exposure due to involvement in an extensive variety of foods, being under the target of rigorous European Community legislation. In context, the projections of Brazilian agribusiness provide food security among the goals, whose broad monitoring dependent on imports of kits for analysis has become an indisputable throat. Aiming to supply national immunochemical reagent, the work aims at the production of mAb IgG anti-OTA employing hybridoma OTA.1 in synthetic medium for development of immunobiological tools. Cultivation of hybridoma OTA.1 was initiated in RPMI medium with 10% fetal bovine serum, followed by gradual adaptation to 100% of the H-SFM (Hybridoma Serum-Free Medium). The precipitation with ammonium sulfate, followed by electrophoresis analysis showed a higher purity of the mAbs produced in the medium 100% H-SFM, as well as more activity anti-OTA analyzed by indirect ELISA (i-ELISA). This mAb higher purity allowed development of ic-ELISA standardized for use under the title of 1:10,000, coupled to the conjugate OTA-BSA diluted to 1:30,000. For the development of IAC based on support activated Affi-Gel 10 was mixed mAb cultivation in 75 and 100% H-SFM (1:1), to fabricate IACs with 5, 10 and 20 mg of IgG ml⁻¹ gel who were named CIA 5, 10 and 20, respectively. The sites of Affi-Gel uncoupled with IgG were capped with ethanolamine or glycine, and the effects evaluated for immobilization rate of IgG to the gel, retention OTA and specific activity of IAC developed. There was no significant difference in the rate of immobilization for the IACs capped with ethanolamine or glycine ($p < 0.05$), obtaining 86.43 and 83.75% for IACs 5; 85.18 and 83.83% for IACs 10 and 88.5 and 87.93% for CIAs 20, capped with ethanolamine and glycine respectively. Regarding the retention rate of OTA (20 ng) were obtained by the IACs rates of 72.08 and 70.30% by the IACs 5; 76.85 and 74.23% for IACs 10 and 67.20 and 56.75% by the 20 IACs with ethanolamine and glycine respectively. No significant difference was found between IACs 5 and between IACs 10, but between the IACs 20 ($p < 0.05$), resulting in lower retention rate by the IAC capped with glycine. As to the specific activity (ng OTA retained mg⁻¹IgG immobilized), the IACs 5 showed higher activity, being 6.54 and 6.66, compared to IACs 10 who showed 3.58 and 3.52 and IAC 20s, 1.50 and 1.28 respectively for capping with ethanolamine and glycine, no significant differences between the IACs with the same concentration of IgG immobilized. Due to a higher retention rate of OTA and highest specific activity obtained for the IACs 5 and 10, suggests that they are implemented in validation studies in food matrix, being capped with ethanolamine due to the lower cost. It is also highlighted that the mAb produced by hybridoma OTA.1 showed high specificity reaching title of 1:10,000 in ic-ELISA and constituted a promising reagent for use in sensitive bio tools emphasizing the need for continuous improvement in technology of production of immunoreagents.

Keywords: Monoclonal antibody. IgG anti-OTA. ic-ELISA. Immunoaffinity column.

1 INTRODUÇÃO

Metodologias analíticas capazes de detectar pequenas concentrações residuais são fundamentais na garantia de qualidade na cadeia produtiva de alimentos, com destaque ao método cromatográfico (SOLEAS *et al.*, 2001; PITTET & ROYER, 2002). Em paralelo, a imunquímica baseada no ensaio imunoenzimático ELISA e cromatografia por imunoafinidade (CIA) empregando anticorpo monoclonal (AcM) tem sido aprimorada na triagem rápida (SCOTT & TRUCKSESS, 1997; SIBANDA *et al.*, 2002, FUJII *et al.*, 2006).

Ocratoxina A (OTA) destaca-se pelo risco de exposição devido a ocorrência em extensa variedade de alimentos, estando sob a legislação da Comunidade Européia (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2005). OTA é produzida por gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo classificada no grupo 2B, i.e. carcinogênico para animais e possível carcinógeno para humano pela *International Agency for Reserch on Cancer* (IARC, 1993; KAMP *et al.*, 2005; SAUVANT *et al.*, 2005; CASTEGNARO *et al.*, 2006).

Monitoramento contínuo tem sido o procedimento recomendado no controle de qualidade de alimentos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada à coluna de imunoafinidade (CIA), proporciona limpeza, elimina os interferentes e, tem sido a metodologia recomendada para análise quantitativa de OTA, conforme Associação Internacional de Analistas Químicos (AOAC, 1995; VISCONTI *et al.*, 1999; GILBERT & ANKLAM, 2002; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

Além de CIA, outros métodos imunquímicos vêm despontando no espaço analítico, a exemplo de ELISA, biosensores e separação imunomagnética, baseado em vantagens como simplicidade, sensibilidade, especificidade, menor quantidade de solventes, fácil execução permitindo diagnóstico rápido (SCOTT & TRUCKSESS, 1997; LOBEAU *et al.*, 2005). Aprimorando os imunoenaios iniciais desenvolvidos com anticorpo policlonal-AcP (THIRUMALA *et al.*, 2000), a técnica de produção de hibridomas introduziu anticorpo monoclonal (AcM), incorporando como principal vantagem a alta especificidade e produção em larga escala.

A eficiência na separação de analito dos interferentes de matriz alimentar depende da qualidade de anticorpo destinado ao desenvolvimento de bioferramenta, i.e. especificidade e reatividade cruzada com os análogos. Em relação à CIA, deve-se considerar também a quantidade de anticorpo imobilizado, bem como o suporte sólido com alta

capacidade de ligação, em detrimento a ligação inespecífica (PFEIFFER *et al.*, 1987; WIMALASENA & WILSON, 1991; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; SHELVER *et al.*, 2002,).

As projeções no agronegócio brasileiro prevêm segurança alimentar entre as metas estratégicas, cujo amplo monitoramento dependente de importação de kits para análise tornou-se um gargalo incontestável. Além de crescente exigência perante regulamentações pelos países importadores, métodos analíticos sensíveis, específicos e validados são cruciais para atender a demanda nacional, proporcionando efetivo controle de qualidade na cadeia produtiva de alimentos. Visando suprir reagente imunoquímico acessível à realidade nacional, o trabalho pretende contribuir com a produção e purificação de AcM destinado ao desenvolvimento e padronização de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) e CIA para análise de OTA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DE HIBRIDOMA

O hibridoma linhagem OTA.1 secretora de AcM (isotipo IgG₁ kappa) específico para OTA derivado de mieloma linhagem Sp2/0-Ag14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, foi produzido por Kawamura *et al.* (1989), na *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo*, Japão.

Os hibridomas estocados em nitrogênio líquido (-185° C) foram descongelados e reativados em meio RPMI 1640 (GIBCO-Invitrogen life Technologies) com 10 % de SFB (soro fetal bovino) (GIBCO-Invitrogen life Technologies). As células recuperadas foram avaliadas por microscopia quanto às características morfológicas e viabilidade celular, utilizando-se corante vital Azul de Trypan (Acros Organics, USA). O cultivo dos hibridomas foi iniciado em meio RPMI com 10 % SFB (37° C, 5 % CO₂), seguido de adaptação gradual por adição de 10, 20, 30, 50, 75 e 100 % de meio H-SFM, suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina (Gibco Co., USA). Os sobrenadantes dos cultivos foram colhidos após 4 a 5 dias de incubação sem reposição de meio e foram centrifugados (2400 x g, 10 min a 4° C), ficando guardados sob refrigeração a 4° C para posterior purificação (HARLOW & LANE, 1988b). O volume de sobrenadante do cultivo em 100% H-SFM foi concentrado aproximadamente três vezes pelo

método de ultrafiltração antes de ser purificado (sistema Stirred Cell 8400, Millipore Co., Bedford, MA, USA) utilizando membranas de exclusão molecular de 100 kDa (YM 100, celulose, Millipore., Bedford, MA, USA).

2.2 PURIFICAÇÃO DE ACM IGG ANTI-OTA POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

Para purificação de IgG foi adicionado sulfato de amônio PA (Nuclear) até concentração final de 50% de saturação (313 g/L) para o sobrenadante dos cultivos em RPMI (10% SFB) e em H-SFM 10% a 50%, enquanto para sobrenadante de 75% e 100% H-SFM adicionou-se até 60 % de saturação (390 g/L), sob agitação a 4° C por 16 horas e após, procedeu-se centrifugação (8000x g, 30 min a 4° C). O precipitado contendo IgG foi suspenso em pequeno volume de tampão PBS (10 mM, pH 7,3) (aproximadamente 10% do volume original) e dialisado contra mesmo tampão (4 x 1 L) a 4° C por 16 horas, seguida de água ultra-pura (Purelab Elga, Lane End, England) por mais 16 horas a 4° C (HARLOW & LANE, 1988c;. VANKOVÁ *et al.*, 1998). Após diálise, a concentração de IgG foi determinada pelo método de Bradford (1976); o grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme método de Laemmli (1970) e a atividade anti-OTA por i-ELISA (item 2.5) (KAWAMURA *et al.*, 1989).

2.3 PADRÃO DE OTA

Padrão de OTA foi adquirido de Sigma (St. Louis, MO, USA) e a concentração determinada por espectrofotometria (M: 403; λ : 333 nm; ϵ : 5500M). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau HPLC (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

2.4 PREPARO DE CONJUGADO OTA-BSA

O conjugado OTA-BSA foi preparado segundo Kawamura *et al.* (1989), dissolvendo-se 10mg de soro albumina bovina (BSA) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) em 1 mL de solução de NaCl a 0,1 M. Paralelamente, preparou-se a mistura de 1 mg de OTA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) em 24 μ L de etanol e adicionou-se 1 mL de tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,1 M pH 7,0 e 5 mg de 1-etil-3,3'-dietilaminopropilcarbodiimida (EDPC). As duas soluções foram misturadas e agitadas lentamente (50 rpm) a

25 °C em incubadora (shaker MA830/A, Marconi ® Laboratório) por 20 horas. A solução foi dialisada três vezes em 1 L de PBS (10 mM, pH 7,4) a 4 °C por 24 horas e a concentração protéica avaliada pelo método de Bradford (1976). O volume final foi adicionado de 1% de azida sódica (Waco Pure Chemical Industries) a 10% e mantido a 4 °C para uso e a - 20 °C para estoque.

2.5 PREPARO DE SUBSTRATO TMB

Dez miligramas de 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi dissolvido em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Lab Synth) e estocado a -20 C. Para uso, 100 µL foi adicionado em 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), seguido de 100 µL de H₂O₂ a 0,5%, sendo a mistura lentamente homogeneizada.

2.6 PROCEDIMENTO DE ELISA INDIRETO (I-ELISA) PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ACM IGG ANTI-OTA

A microplaca (96 poços) de poliestireno (Corning, USA) foi revestida com 100 µL de conjugado OTA-BSA 1:30.0000 (77 ng/mL; 7,7 ng/poço) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6 e incubada por 18 h a 4 °C. Após incubação, a microplaca foi lavada quatro vezes com PBST 0,05% (PBS 10 mM, pH 7,3 + 0,05% Tween 20) e bloqueada (200µL/poço) com ovoalbumina (OVA) a 0,1% em PBS (10 mM, pH 7,3), com incubação por 4 h a 25 °C. Após nova lavagem (quatro vezes com PBST), 100 µL de IgG anti-OTA na diluição de 1:100, obtido de cultivo em meio RPMI (10% SFB) e em meio H-SFM (20, 30, 50 75 e 100%) foram adicionados, seguido de incubação (18 h a 4 °C). Lavagem (quatro vezes com PBST) foi realizada e 100 µL de conjugado anti-IgG ligado a HRP- *Horseradish* Peroxidase (IgG-HRP) (1:1.000) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foram adicionados, seguido de incubação (25° C - 1 hora). Em seguida foi realizada lavagem (seis vezes com PBST) e adição de 100 µL de substrato cromógeno TMB com incubação de 20 min a 25° C. A reação enzimática foi paralisada com 50 µL de H₂SO₄ a 1 M e absorvância lida a 450 nm (Expert Plus, Asys, Cambridge, reino Unido) (KAWAMURA *et al.*, 1989).

2.7 PROCEDIMENTO DE I-ELISA PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DO TÍTULO DE ACM IGG ANTI-OTA PARA APLICAÇÃO EM IC-ELISA

Realizou-se diferentes diluições do AcM IgG anti-OTA produzido em meio 100% H-SFM a fim de se avaliar a concentração necessária para obter 50% de ligação (título) para posterior aplicação na padronização do ic-ELISA. A microplaca (96 poços) de poliestireno foi revestida com 100 μ L de conjugado OTA-BSA 1:30.0000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6 e incubada 18 h . Após, foi lavada quatro vezes com PBST e bloqueada (200 μ L/poço) com OVA a 0,1% em PBS, com incubação por 4 h a 25°C. Após nova lavagem (quatro vezes com PBST), 100 μ L de IgG anti-OTA obtido de cultivo em 100% H-SFM foram diluídos em PBST e adicionados nas diluições: 1:10; 1:100; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000 e 1:10.000.000, seguido de incubação (18 h a 4 °C). Lavagem (quatro vezes com PBST) foi realizada e 100 μ L IgG-HRP (1:1.000) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foram adicionados, seguido de incubação (25° C - 1 hora). Em seguida foi realizada lavagem (seis vezes com PBST) e adição de 100 μ L de substrato cromógeno TMB com incubação de 20 min a 25° C. A reação enzimática foi paralisada com 50 μ L de H₂SO₄ a 1 M e absorvância lida a 450 nm (KAWAMURA *et al.*, 1989).

2.8 PADRONIZAÇÃO DE IC-ELISA

Para a padronização de ic-ELISA foi avaliada a combinação de diferentes diluições do conjugado OTA-BSA (1:10.000; 1:20.000 e 1:30.0000) com diferentes diluições de AcM IgG anti-OTA a fim de se determinar a diluição ótima de OTA-BSA e título de AcM IgG anti-OTA. A microplaca foi revestida com 100 μ L de OTA-BSA em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6 e incubada (18 h a 4 °C). Após, a microplaca foi lavada quatro vezes com PBST e bloqueada (200 μ L/poço) com OVA a 0,1% em PBS, sendo a incubação por 4 h a 25°C. Após nova lavagem (quatro vezes com PBST), para a etapa de competição foram aplicados 50 μ L de padrão de OTA nas diluições de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 e 10 ng OTA/mL metanol:PBST (1:9), constituindo a curva de calibração e 50 μ L de IgG anti-OTA, nas diluições: 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000 em PBST, seguido de incubação (18 h a 4 °C). Lavagem (quatro vezes com PBST) foi realizada e 100 μ L de conjugado IgG-HRP (1:1.000)

foram adicionados, seguido de incubação a 25° C por 1 hora. Em seguida foi realizada lavagem (seis vezes com PBST) e adição de 100 µL de substrato cromógeno TMB com incubação de 20 min a 25° C. A reação enzimática foi paralisada com 50 µL de H₂SO₄ a 1 M e absorvância lida a 450 nm (KAWAMURA *et al.*, 1989).

2.9 DESENVOLVIMENTO DE CIA BASEADO EM IMUNOSSUPORTE AFFI-GEL 10

Primeiramente realizou-se o acoplamento de AcM anti-OTA ao suporte Affi-Gel 10 (éster de N-hidroxisuccinimida) (BIO RAD). O suporte ativado Affi-Gel foi lavado por três vezes com água ultra-pura (volume igual a três vezes o volume do gel) e a seguir adicionado de solução de AcM IgG anti-OTA (5, 10 e 20 mg, procedentes do cultivo em 75 e 100% H-SFM, na proporção 1:1) em PBS, sendo o volume de solução de IgG em PBS na proporção de 2:1 em relação ao gel. Após homogeneização a mistura foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação orbital lenta para que ocorresse a reação de imobilização/acoplamento de IgG ao gel. Após, filtrou-se o gel (à vácuo) para retirada da solução com IgG não acoplados (guardada para avaliação de teor protéico) e adicionou-se solução de bloqueio para capeamento dos sítios ativos não acoplados por IgG, sendo testadas duas soluções etanolamina-HCl 1,0 M (pH 8,0) (Aldrich) e glicina-etil-éster 1,0 M (pH 8,0) (Aldrich). Após incubação por 1 hora em temperatura ambiente a solução de bloqueio foi retirada por filtração (guardada para avaliação de teor protéico) e o gel lavado com volume de PBS correspondente a 10 vezes o volume do gel, sendo que este foi dividido em dez alíquotas, para se proceder dez lavagens por filtração. O filtrado correspondente a décima lavagem foi guardado para avaliação do teor protéico. O gel acoplado foi distribuído em alíquotas de 0,5 mL em colunas de polipropileno (Muromac Columns, Japão) as quais foram armazenadas com PBS + 0,02% de azida sódica (Waco purê Chemical Industries) e mantidas sob refrigeração a 4 °C até o uso (BIO-RAD LABORATORIES, 2000; MIYAMOTO *et al.*, 2008).

2.10 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO DE AcM IGG

Foram avaliadas três concentrações de AcM IgG anti-OTA (5; 10 e 20 mg) determinadas previamente por método de Bradford. Após cada etapa da confecção da CIA foi coletada solução remanescente da filtração, sendo do pós-acoplamento, pós-bloqueio com

etanolamina ou glicina e após décima lavagem com PBS para avaliação do teor de proteínas (MIYAMOTO *et al.*, 2008). A quantidade de IgG imobilizada ao gel foi calculada por diferença entre a quantidade de IgG em solução antes e após a imobilização, sendo o cálculo representado pela seguinte equação:

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

*Proteína sobrenadante (pós-acoplamento+ pós-bloqueio+ pós 10° lavagem PBS)

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados referentes ao desenvolvimento de CIA Affi-Gel (CIA 5, 10 e 20) foram resumidos por meio de média e desvio padrão apresentados na forma de tabelas. A comparação entre os efeitos de etanolamina e glicina na taxa de imobilização de IgG anti-OTA, na taxa de retenção de OTA e na atividade específica foi feita pelo teste ANOVA e o *post hoc test* utilizado foi o de Tukey, sendo que diferenças significativas foram estabelecidas para $p \leq 0,05$ através da utilização do software SPSS versão 15.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE ACM IGG ANTI-OTA ATRAVÉS DE CULTIVO DE HIBRIDOMA OTA.1, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-OTA

Imunoensaios baseiam-se na interação específica entre antígeno (Ag) e Ac, sendo que o Ac deve ter alta especificidade, baixa reatividade cruzada e disponibilidade (HARLOW & LANE, 1988a; HEFLE, 1995; NAKANO & NAGATA, 2003). Sua obtenção depende de Ag imunogênico purificado, protocolo de imunização e técnicas de purificação (NEWSOME, 1986; HEFLE, 1995). Ocratoxina, assim como outras micotoxinas são haptenos, não estimulando o sistema imune para produção de Ac, necessitando conjugação com proteínas carreadoras como BSA, para tornarem-se imunogênicas (GAZZAZ *et al.*, 1992; HEFLE, 1995; XIAO *et al.* (a), 1995; KIM *et al.*, 2003).

Inicialmente, os imunoensaios utilizaram AcP, produzido em coelhos ou carneiros, mas limitações surgiram para produção em grande escala, como fornecimento de

Ag altamente purificado, manutenção de biotério e variabilidade individual do animal (WYATT, 1992; THIRUMALA *et al.*, 2000). Com o surgimento da técnica de produção de hibridomas foi possível produzir AcM com alta especificidade e homogeneidade na estrutura. A técnica consiste em imunização de camundongo com Ag específico, retirada de células esplênicas secretoras de Ac, seleção e fusão com célula de mieloma. O hibridoma resultante pode ser cultivado em meios sintéticos de composição definida ou na cavidade peritoneal de camundongo (HARLOW & LANE, 1988 a e b; LA PINE & HILL, 2001).

Cultivo em cavidade peritoneal proporciona maior concentração de Ac, mas possui limitações técnicas como: estrutura para manutenção de animais, questões éticas no uso de animais para experimentação, presença de hemácias, fibrina e proteínas inespecíficas no líquido ascítico que dificultam a purificação (BRUCE *et al.*, 2002). Já o cultivo em meio sintético, (ex. H-SFM) livre de SFB eliminou esses interferentes (LIDDELL & CRYER, 1991; BRUCE *et al.*, 2002; LEGAZPI *et al.*, 2005), mas fornece menor quantidade de IgG (HARLOW & LANE, 1988b), sendo necessário utilizar estimulantes de crescimento como L-glutamina para se obter maior concentração (BRUCE *et al.*, 2002; LEGAZPI *et al.*, 2005).

O hibridoma OTA.1 utilizado neste experimento foi produzido por Kawamura *et al.* (1989) sendo a OTA conjugada com BSA para imunização. Através de análise por ic-ELISA, o AcM IgG anti-OTA produzido apresentou reatividade cruzada com OTA de 100 %; com OTC de 63,1 %, e reagiu fracamente com os outros análogos, sendo para OTB 0,63%, para OT α 0,06 % e para 4-hidroxi-OTA 1,19 % de reatividade, o que demonstra a especificidade imunológica do reagente produzido (tabela 1).

Tabela 1 – Reatividade cruzada de anticorpo monoclonal IgG anti-OTA.1

Análogos de Ocratoxina	Reatividade cruzada (%)*
Ocratoxina A	100
Ocratoxina C	63,1
(4R)-4-Hidroxiocratoxina A	1,19
Ocratoxina B	0,63
Ocratoxina α	0,06

* $[X/Y] \times 100$, sendo X, a quantidade de OTA requerida para inibir 50% da ligação de IgG; Y, quantidade de análogo requerido para atingir a mesma % de inibição (Kawamura *et al.*, 1989).

O cultivo do hibridoma OTA.1 foi iniciado em meio RPMI com 10% de SFB. A suplementação com SFB é essencial para recuperação celular pós- descongelamento,

fornecendo fatores hormonais e proteínas carreadoras de minerais, hormônios, lipídeos e outros nutrientes essenciais. Gradativamente as células foram adaptadas (tabela 2) ao cultivo em meio H-SFM, iniciando-se com 10%, passando para 20, 30, 50, 75 até atingir 100%. A produção de AcM em 100% H-SFM caracteriza-se como condição ideal, visto esse meio não conter SFB e possuir baixa concentração protéica (20µg/mL de transferrina e insulina), diminuindo assim o teor de proteínas interferentes no processo de purificação de AcM, bem como na padronização de imunoenaios (HARLOW & LANE, 1988 b; BRUCE *et al.*, 2002; LEGAZPI *et al.*, 2005).

Tabela 2 – Adaptação de hibridoma OTA.1 ao meio H-SFM: produção, purificação e atividade de anticorpo monoclonal Anti-OTA

Meio de cultura (%)		Produção de AcM anti-OTA				
H-SFM	RPMI + 10% SFB	Sobrenadante (mL)	Volume (mL)	Pós-dialise		Atividade anti-OTA**
				Proteína* mg/mL	total (mg)	
0	100	800	80	36,3	2.904	0,900
20	80	720	72	33,5	2.412	0,960
50	50	900	90	23,5	2.115	1,240
75	25	1.200	120	6,0	720	2,300
100	0	1.200	120	1,3	156	2,460

SFB - soro fetal bovino.

*Determinado por método de Bradford (1979)

**Determinada por i-ELISA450 nm

Purificação de Acs utilizando sulfato de amônio é método comumente utilizado para remover proteínas de uma solução, pois trata-se de sal com alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade. A tabela 2 apresenta os volumes de sobrenadantes dos cultivos obtidos ao longo da adaptação do hibridoma OTA.1 ao meio H-SFM, bem como o volume final e a concentração protéica obtidos pós-purificação. Foi possível observar que conforme foi aumentando a proporção de meio H-SFM ao cultivo, menor teor protéico foi encontrado, sendo 33,5 mg/mL para cultivo em 20% H-SFM e de 1,3 mg/mL em 100% H-SFM. Mesmo sendo essa concentração menor em relação ao obtido nos outros cultivos, provavelmente seja a mais próxima do valor real de AcM produzido, uma vez que o meio H-SFM é pobre em proteínas.

Na eletroforese (figura 1) evidencia-se para AcM IgG anti-OTA obtido em 100% H-SFM, menor número de bandas e estas bem definidas, visualizando-se entre elas uma

banda de aproximadamente 25 kDa e outra de 50kDa provavelmente decorrentes da quebra das moléculas de IgG pelo mercaptoetanol, uma vez que IgG é uma molécula glicoprotéica com massa molecular de aproximadamente 150 kDa, consistindo em tetrâmero com duas cadeias leves (25 kDa) e duas cadeias pesadas (50 kDa) idênticas. Assim, confirma-se que cultivo de hibridoma em meio 100% H-SFM possibilita obter AcM com maior pureza, ou seja, com menor quantidade de outras proteínas que podem interferir na padronização de imunoenaios, como ELISA por exemplo.

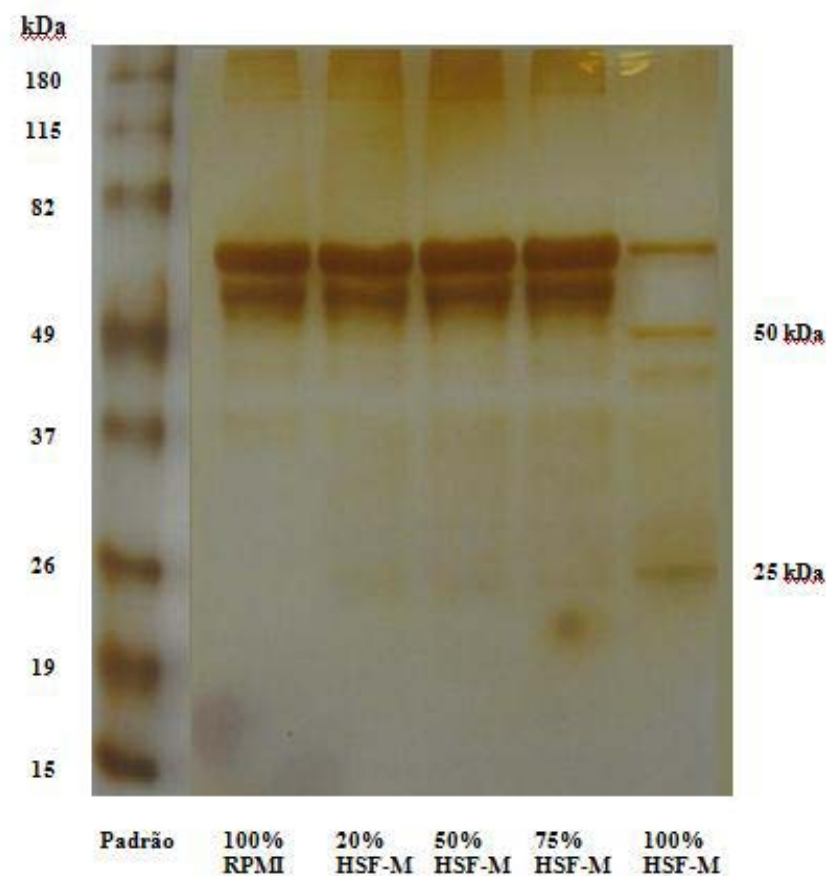


Figura 1 – Perfil eletroforético pós-diálise de AcM IgG anti-OTA produzido durante adaptação no meio H-SFM em SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio- Gel de Poliacrilamida, corado com nitrato de prata). Padrão: marcador de proteína (Bench Mark™ protein Ladder, Invitrogen, USA)

Para purificação dos AcM, foi testado inicialmente 40% de saturação de sulfato de amônio para sobrenadante de meio RPMI (10% SFB), e de meio 20, 50 e 75% H-SFM, obtendo precipitação satisfatória, com exceção de H-SFM 75%, que formou pequeno precipitado e o sobrenadante permaneceu turvo. Assim, avaliou-se precipitação com 50% de saturação para H-SFM 75%, bem como para o sobrenadante de 100% H-SFM, obtendo-se rendimento ainda melhor para RPMI (10% SFB) e H-SFM (20 e 50%), enquanto que 75 e

100% H-SFM continuaram turvos e para estes foi avaliada saturação com 60% de sulfato de amônio, que proporcionou boa precipitação. Com base nesses resultados, preconizou-se utilizar 50% de saturação para sobrenadantes provindo de meio RPMI (10% SFB) e de 20 a 50% H-SFM e 60 % de saturação para sobrenadantes de 75 a 100% H-SFM.

Como já exposto anteriormente o cultivo em meio 100% H-SFM proporciona baixa quantidade de proteínas o que é vantajoso em relação à pureza do AcM IgG produzido, mas por outro lado dificulta o processo de precipitação do mesmo pelo sulfato de amônio, sendo necessária a concentração do sobrenadante antes da precipitação. Neste estudo foi concentrado aproximadamente três vezes o volume do sobrenadante do cultivo pelo método de ultrafiltração utilizando membranas de exclusão molecular (100 kDa).

A qualidade do Ac utilizado é fator decisivo para a obtenção de sensibilidade e especificidade em imunoenaios. Estudo comparando a eficiência de AcP e AcM em imunoenasiao competitivo para micotoxinas, mostrou sensibilidade e especificidade superior nos ensaios com AcM, sendo que sua utilização garante a competição entre Ags pelo mesmo sítio de ligação do Ac, o qual é altamente específico (HEFLE, 1995).

Neste estudo, a atividade anti-OTA dos AcMs produzidos nos cultivos durante adaptação ao meio H-SFM, pós-diálise foi avaliada por i-ELISA. Observou-se (tabela 2) valores de absorvância (450 nm) crescentes conforme aumentou a proporção de meio H-SFM. Os cultivos com menor quantidade de H-SFM apresentaram maior teor protéico e menor absorvância, indicando menor atividade de AcM. Esse maior teor protéico é referente à grande quantidade de proteínas provindas do SFB, sendo que a quantidade de AcM IgG anti-OTA ainda está baixa, pois sua produção está iniciando, chegando ao máximo e com maior atividade em 75 e 100% H-SFM, representada pelos maiores valores de absorvância.

3.2 PADRONIZAÇÃO DE IC-ELISA: DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO DE CONJUGADO OTA-BSA E DE TÍTULO DE ACM IGG ANTI-OTA

Para o desenvolvimento e padronização de ic-ELISA neste trabalho foi escolhido AcM IgG anti-OTA obtido do cultivo em 100% HSF-M, devido a maior pureza o que possibilita menor interferência no ensaio. Foi realizado i-ELISA para determinar o título a ser utilizado na padronização de ic-ELISA, representado pela diluição de IgG necessária para atingir 50% de ligação em relação a concentração inicial. A figura 2 mostra que as diluições de 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000 estão próximas a 50% de ligação, sendo que a diluição de

1:2.000 apresentou absorvância de 1,680; enquanto 1:5.000, de 1,220 e 1:10.000 de 0,920. Assim, essas diluições foram escolhidas para serem avaliadas com diferentes diluições do conjugado OTA-BSA. Alguns experimentos foram realizados anteriormente com diferentes diluições de OTA-BSA (1:5.000 à 1:40.000) e padrões de OTA e observou-se através de ic-ELISA que as diluições 1:10.000; 1:20.000 e 1:30.000, apresentaram resultados de absorvância muito próximos, assim decidiu-se avaliar as três diluições na padronização deste ic-ELISA, uma vez que este ensaio tem a aplicação de padrão de OTA (curva de calibração) e de amostras que podem estar contaminadas na etapa de competição, podendo sofrer algum tipo de interferência.

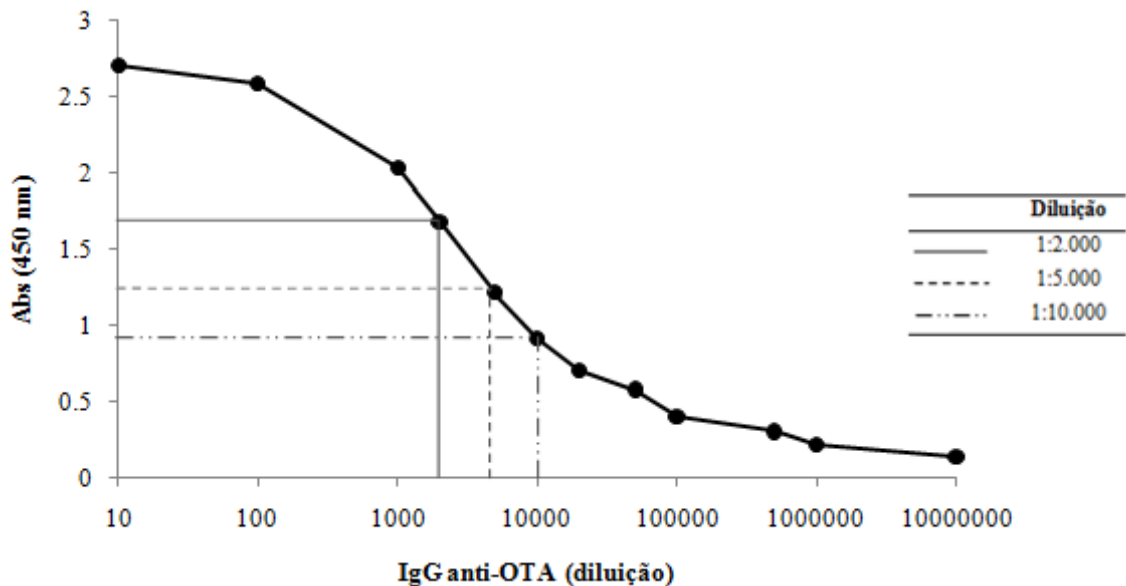


Figura 2 – Perfil do título de AcM IgG anti-OTA produzido por Hibridoma OTA.1 em cultivo em meio 100% H-SFM determinado por i-ELISA.

A figura 3 mostra as curvas de calibração (concentrações de OTA de 0,1 a 10 ng/mL) obtidas no ic-ELISA com a combinação dessas diferentes diluições de IgG anti-OTA e OTA-BSA e os coeficientes de determinação (R^2). A combinação de conjugado OTA-BSA 1:30.000 e de IgG anti-OTA 1:10.000, apresentou R^2 de 0,9930, indicando a melhor combinação e ajuste das variáveis. Fujii *et al.* (2006), padronizaram ic-ELISA para detecção de OTA em café utilizando IgG anti-OTA na diluição de 1:1.000, produzido a partir de hibridoma OTA.7, enquanto neste trabalho foi possível utilizar IgG anti-OTA produzido pelo hibridoma OTA.1 na diluição de 1:10.000. OTA apresenta característica hidrofóbica, o que favorece interação de alta afinidade ao sítio ativo de IgG anti-OTA. Este fato, somado a alta

especificidade e estabilidade do reagente produzido neste trabalho permitiu a utilização de IgG em altas diluições.

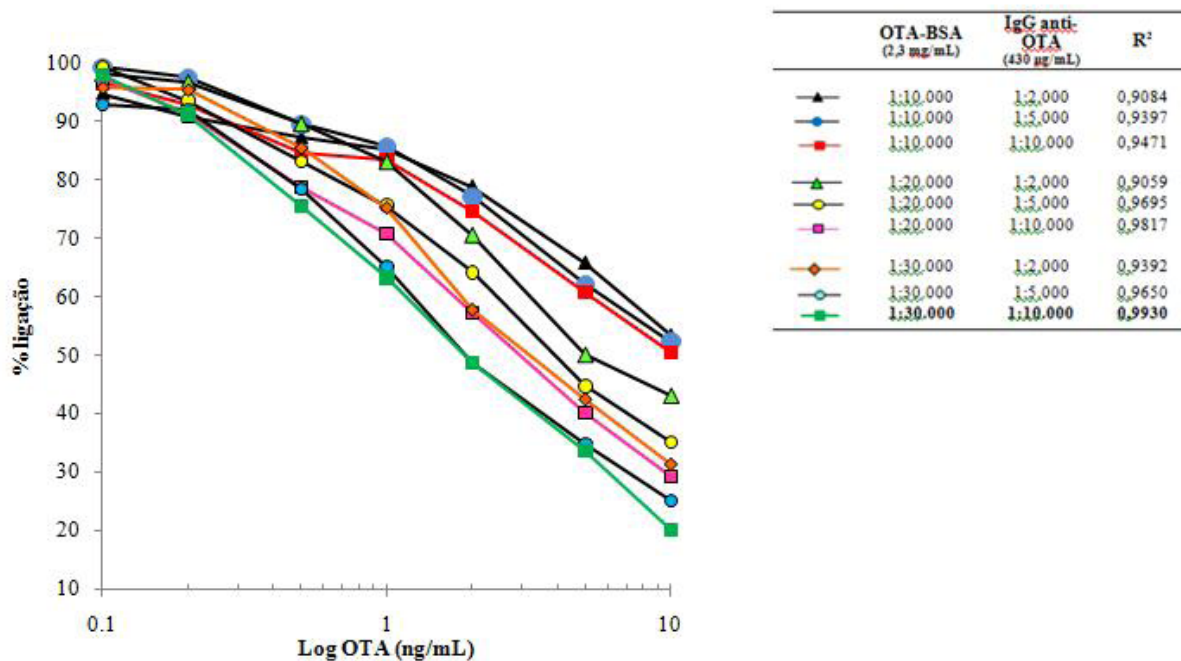


Figura 3 – Padronização de ic-ELISA: determinação da diluição de conjugado OTA-BSA e de título de AcM IgG anti-OTA.

Em relação ao conjugado OTA-BSA, Fujii *et al* (2006) utilizaram em concentração de 4,76 µg/mL, muito superior (aproximadamente 60 vezes) ao utilizado neste trabalho de 77 ng/mL. Em outro estudo realizado pelos mesmos autores, onde avaliaram a atividade de AcM IgG anti-OTA, produzido pelo cultivo de hibridoma OTA.1, através de i-ELISA, OTA-BSA foi utilizado na etapa de sensibilização na concentração de 0,79 µg/mL, aproximadamente 10 vezes o utilizado neste trabalho. Assim, podemos concluir que o conjugado OTA-BSA, reagente preparado em nosso laboratório foi de excelente qualidade, podendo ser utilizado em altas diluições, somando-se ainda a alta estabilidade apresentada durante mais de dois anos de utilização, mantendo a mesma diluição de uso de 1:30.000. Ressalta-se ainda a importância da padronização de cada etapa de um imunoenensaio, mesmo quando se utiliza protocolo idêntico ao de outros estudos já padronizados, pois, observa-se grande variação nas concentrações dos reagentes, sejam comerciais ou produzidos no próprio laboratório.

Por se tratar de ic-ELISA escolheu-se utilização de marcador enzimático HRP conjugado à IgG e o substrato TMB. IgG-HRP apresenta a vantagem de ser disponível para compra e poder ser utilizado em outros imunoenaios, independentemente de qual seja o antígeno. Já, os conjugados micotoxinas-HRP, utilizados em ELISA competitivo direto (c-ELISA), restringem-se a cada diferente micotoxina, elevando o custo quando se deseja analisar diferentes micotoxinas. Optou-se pela preparação em laboratório do substrato cromogênico TMB, em função de menor custo e maior estabilidade do reagente em pó, com maior validade, uma vez que o preparo vai sendo realizado de acordo com a necessidade.

3.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CIA BASEADA EM IMUNOSSUPORTE AFFI-GEL 10

CIAs para micotoxinas são desenvolvidas utilizando AcP ou AcM produzido contra micotoxina específica o qual é imobilizado em um gel. Para que a CIA possa realizar eficiente separação da micotoxina de outros compostos da matriz alimentar, deve ser constituída de anticorpo (Ac) com alta especificidade e pouca ou nenhuma reatividade cruzada. Destaca-se a importância do parâmetro especificidade, em relação à extensão do reconhecimento da micotoxina, em comparação com co-extrativos estruturalmente similares que podem estar presentes na matriz, os quais não devem ser reconhecidos pelo Ac. A capacidade da coluna em termos de número total de sítios de Acs disponíveis também é fundamental, pois uma sobrecarga da coluna conduzirá a baixa recuperação (SENYUVA & GILBERT, 2010). A afinidade da ligação entre Ac-Ag pode ocorrer por interação hidrofóbica, ligação eletrostática, força de Van der Waals e pontes de hidrogênio, todas relacionadas à características conformacionais e eletrônicas (HOLTZAPLLE *et al.*, 1996).

Importância também deve ser dada à escolha do imunossuporte utilizado para imobilização/acoplamento do anticorpo, o qual deve apresentar alta capacidade de ligação e ao mesmo tempo evitar ligações inespecíficas. Deve ser química e biologicamente inerte; facilmente ativado e mecanicamente estável. Sua reatividade é diretamente dependente da orientação da imobilização do Ac, bem como do método de ativação da matriz e do grupo reativo disponível no Ac para o acoplamento. Podem ser constituídos de polissacarídeos como celulose, agarose, *Sepharose* (PFEIFFER *et al.*, 1987; WIMALASENA & WILSON, 1991; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; SHELVER *et al.*, 2002,).

Acoplamento orientado do Ac propicia maior capacidade de ligação ao Ag, pois possibilita maior acessibilidade estérica aos sítios ativos de ligação. No processo de imobilização de IgG ao suporte ativo Affi-gel 10, utilizado neste trabalho, ocorre ligação não dirigida, ou seja, aleatória. No entanto, pelo fato deste suporte possuir cadeia de 10 C, é possível que o espaço ocupado pelos átomos permita certa liberdade conformacional para que o Ac encontre espaço suficiente para ligação ao Ag (VANKOVÁ *et al.*, 1998).

O imunossuporte Affi-Gel 10 promove ligação com a molécula de anticorpo via aminas primárias (BIO-RAD LABORATORIES, 2000), sendo que depois da adição de IgG ocorre deslocamento da porção N-hidroxisuccinimida e uma ligação amida estável é formada. Como o éster reativo está imobilizado no gel e apresenta alta seletividade para grupos amina primários, falsas reações com outros ligantes são eliminadas (Figura 4).

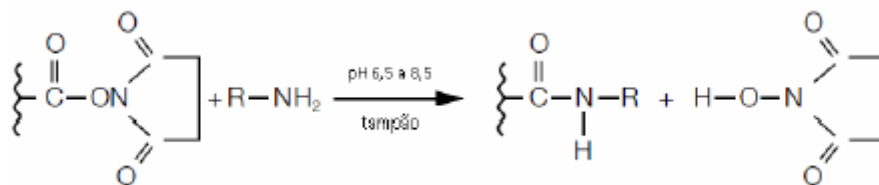


Figura 4 – Reação de acoplamento de AffiGel 10 com um ligante contendo grupos amino livres.

Segundo o fabricante para imobilização de proteínas em suporte ativado Affi-Gel 10 é recomendado a utilização de 25 mg de proteína por mL de gel e volume da solução contendo a proteína entre 1,5 a 4,5 mL/mL de gel (BIO RAD LABORATORIES, 2000). Em nosso estudo para o desenvolvimento e padronização da CIA Affi-Gel 10 foram avaliadas três concentrações de IgG anti-OTA, sendo 5, 10 e 20 mg/mL de gel e volume da solução contendo IgG de 2mL/mL de gel. Para efeito de simplificação de nomenclatura optou-se denominar as CIAs confeccionadas de CIA 5, CIA 10 e CIA 20. Após imobilização de IgG ao gel, 0,5 mL de gel foram acondicionados em colunas de polipropileno (Muromac Columns, Japão) em solução de PBS (figura 5).



Figura 5 – Coluna de imunoafinidade baseada em suporte ativado Affi-Gel-10 empregando AcM IgG anti-OTA.1.

Na tabela 3 estão apresentados os resultados da caracterização das CIAs em relação ao efeito dos agentes bloqueadores etanolamina-HCL 1,0 M (pH 8,0) e glicina-etil-éster 1,0 M (pH 8,0) na taxa de imobilização de IgG, na da taxa de retenção de OTA e atividade específica de CIA 5, 10 e 20. Para CIAs bloqueadas com etanolamina, foram imobilizados 86,43 % (4,3 mg de IgG) para CIA 5; 85,18 % (8,5 mg) para a CIA 10 e 88,5 % (17,8 mg) para CIA 20. Já para as CIAs bloqueadas com glicina ocorreu imobilização de 83,75 % para CIA 5 (4,2 mg); 83,83% para CIA 10 (8,4 mg) e 87,93 % (17,7 mg) para CIA 20. Não houve diferença significativa na taxa de imobilização entre as CIAs 5, 10 e 20 bloqueadas com etanolamina. Entre as CIAs bloqueadas com glicina houve diferença entre CIA 5 e 10 e entre CIA 10 e 20. Comparando os dois grupos de CIAs capeadas com etanolamina e glicina, não houve diferença na taxa de imobilização entre as CIAs com a mesma concentração de IgG.

Tabela 3 – Caracterização de CIA (5, 10 e 20) confeccionada com suporte Affi-Gel 10: concentração de AcM IgG anti-OTA adicionado e efeito de agente bloqueador na eficiência de imobilização, capacidade de retenção de OTA e atividade específica

Agente bloqueador	IgG anti-OTA				Volume CIA (mL)	Eficiência de CIA na retenção de OTA		
	Adicionado (mg/mL)	Imobilizado (mg/mL)	Imobilizado (mg/CIA)	Imobilização (%) ^b		Retenção (ng) ^a	Retenção (%) ^b	Atividade específica (ng OTA/mg IgG) ^b
Etanolamina-HCL 1,0 M (pH 8,0)	5	4,3±0,07	2,2	86,43±1,65 abcdef	0,5	14,4±0,26	72,08±1,41 ade	6,54 ad
	10	8,5±0,15	4,3	85,18±1,55 bace	0,5	15,4±0,47	76,85±2,36 be	3,58 be
	20	17,8±0,53	8,9	88,50±2,65 cabf	0,5	13,4±0,18	67,20±0,91 cd	1,50 cf
Glicina-etil-éster 1,0 M (pH 8,0)	5	4,2±0,04	2,1	83,75±0,96 deba	0,5	14,0±0,34	70,30±1,60 dac	6,66 da
	10	8,4±0,01	4,2	83,83±0,35 edba	0,5	14,8±0,23	74,23±1,20 eab	3,52 eb
	20	17,7±0,42	8,9	87,93±2,02 fbca	0,5	11,4±0,30	56,75±1,52 f	1,28 fc

^a OTA adicionada (20 ng);

^b Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A taxa de imobilização de IgG foi calculada levando-se em consideração a concentração inicial de IgG aplicada ao gel, e as perdas ocorridas em cada etapa da confecção. Para confirmar esses resultados, escolheu-se a CIA 5 capeada com etanolamina, com taxa de imobilização de 86,43% (4,322 mg) e perda de 13,57% (0,678 mg), para avaliação da atividade anti-OTA ao longo das etapas de confecção, através de i-ELISA. Avaliou-se a solução inicial contendo 5mg de IgG anti-OTA/mL e os sobrenadantes recolhidos no pós-acoplamento (0,546 mg), pós-bloqueio (0,114 mg) e pós 10^o lavagem com PBS (0,0018 mg). Na figura 6 observa-se então o perfil da atividade anti-OTA durante as etapas de confecção da CIA 5. A solução inicial de IgG apresentou altos valores de absorvância, de aproximadamente 2,8 até a diluição de 1:1.000, caindo para aproximadamente 2,4 na diluição 1:10.000, para 2,2 na diluição 1:100.000, mantendo absorvância em torno de 1,0 na diluição 1:1.000.000.

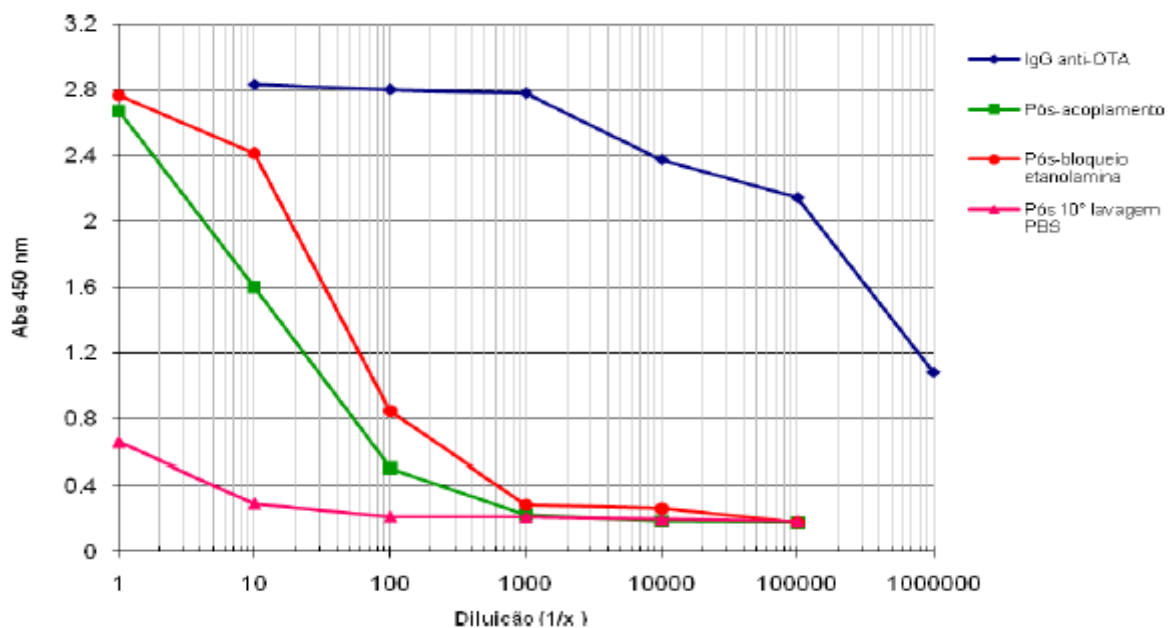


Figura 6 – Perfil de atividade anti-OTA nas etapas de confecção de CIA 5.

A perda de IgG de 13,57% ocorreu durante as etapas de confecção da CIA, podendo ser observada na figura 6, através da atividade de IgG anti-OTA demonstrada pelas absorvâncias obtidas para as soluções recolhidas no pós-acoplamento, pós-bloqueio e pós 10^o lavagem com PBS. Observa-se para as soluções puras do pós-acoplamento e pós-bloqueio, absorvância em torno de 2,6 a 2,7, caindo para aproximadamente 0,6 para pós-acoplamento e para 0,8 para pós-bloqueio com etanolamina na diluição de 1:100. A partir da diluição 1:1.000, as absorvâncias caem para aproximadamente 0,2, significando que já não há

praticamente atividade anti-OTA. Para o sobrenadante obtido pós- 10^o lavagem com PBS, absorvância em torno de 0,6 foi obtida para a solução pura, caindo para 0,2 em diluição de 1:100.

Em seguida avaliou-se a eficiência das CIAs quanto à capacidade de retenção de OTA. Foram aplicados à cada CIA, 10 mL de solução de padrão de OTA com concentração de 2,0 ng/mL em PBS-bicarbonato de sódio a 1 % (1:1), totalizando 20 ng. Para as CIAs bloqueadas com etanolamina as recuperações de OTA retida foram: 72,08 % (14,4 ng) para CIA 5, 76,85% (15,4 ng) para CIA 10 e de 67,2% (13,4 ng) para CIA 20. Para CIAs bloqueadas com glicina houve recuperação de 70,30% (14 ng) para CIA 5; de 74,23% (14,8 ng) para CIA 10 e de 56,75% (11,4 ng) para CIA 20. A análise estatística revelou que houve diferença significativa na taxa de retenção de OTA entre as CIAs 5, 10 e 20, capeadas com etanolamina, sendo a maior recuperação apresentada pelas CIA 10 (76,85%), fato que se repetiu para capeamento com glicina, sendo a maior recuperação da CIA 10 (74,23%). Não houve diferença entre a CIA 5 capeada com etanolamina e CIA 5, com glicina, bem como entre as CIAs 10 dos dois grupos, mas diferença foi encontrada entre as CIAs 20, sendo maior a taxa de recuperação com capeamento por etanolamina.

Finalizando o estudo de caracterização das CIAs, avaliou-se a atividade específica através da relação ng de OTA retida/ mg de IgG imobilizado para cada CIA. Vanková *et al.* (1998) comparando o desempenho de imunossuporte oriundo de acoplamento orientado e aleatório, evidenciaram maior atividade específica de Affi-Gel Hidrazida com acoplamento orientado (0,68 µg citocinas/mg IgG) em relação a Affi-Gel 10 (0,24 µg/mg), cujo acoplamento é aleatório. Neste estudo, para as CIAs bloqueadas com etanolamina, atividade específica (tabela 3) foi de 6,54 para CIA 5; 3,58 para CIA 10 e 1,50 para CIA 20. Para bloqueio com glicina, os resultados foram 6,66 ng OTA/mg IgG para CIA 5; 3,52 para CIA 10 e 1,28 para CIA 20. Pode-se observar que, na medida em que foi aumentando a concentração de IgG imobilizado, foi diminuindo a atividade específica, fato ocasionado provavelmente por bloqueio estérico devido à grande quantidade de moléculas de IgG imobilizadas, diminuindo então a possibilidade de ligação de OTA ao sítio de ligação específico do Ac (WIMALASENA & WILSON, 1991).

Análise estatística demonstrou que houve diferença significativa entre CIA 5, 10 e 20 bloqueadas com etanolamina, bem como entre CIA 5, 10 e 20 bloqueadas com glicina, mas não houve diferença entre as CIAs bloqueadas com etanolamina e glicina para as mesmas concentrações de IgG. Assim, as CIAs 5 dos dois grupos apresentaram resultados

superiores, sendo 6,54 e 6,66, respectivamente para etanolamina e glicina, seguido pelas CIAs 10 (3,58 e 3,52), e por fim pelas CIAs 20 que apresentaram os piores resultados (1,50 e 1,28). Fujji *et al*, 2006, obtiveram atividade específica entre 0,96 a 0,98 para CIAs baseadas em suporte sílica-hidrazida, sendo que as CIAs não foram capeadas. Assim, pode-se afirmar que as CIAs confeccionadas neste trabalho podem ser aplicadas para estudo de validação em matrizes alimentares.

CONCLUSÕES

O AcM IgG anti-OTA obtido do cultivo de hibridoma OTA.1 em meio 100% H-SFM apresentou maior pureza na eletroforese e foi utilizado na padronização de ic-ELISA, com título de 1:10.000 e o conjugado OTA-BSA produzido foi utilizado na padronização em diluição de 1:30.000. Com relação às CIAs confeccionadas não houve diferença significativa entre etanolamina e glicina na taxa de imobilização, nem na atividade específica para as CIAs dos dois grupos com mesma concentração de IgG (CIA 5, 10 e 20). Maiores taxas de recuperação de OTA bem como maior atividade específica foram obtidos pelas CIAs 5 e 10 capeadas tanto por etanolamina como por glicina, em relação à CIA 20. Diferença significativa foi encontrada na retenção de OTA entre as CIAs 20, sendo maior para bloqueada com etanolamina. Em função dos resultados encontrados para as CIAs 20 em comparação às CIAs 5 e 10 e levando-se em consideração que CIA 20 é confeccionada com concentração de IgG quatro vezes e duas vezes superior que CIA 5 e CIA 10 respectivamente, não sendo interessante do ponto de vista econômico, concluiu-se que CIAs 5 e 10 capeadas com etanolamina são indicadas para se continuar estudos posteriores de validação envolvendo testes em matriz alimentar.

5.2 SINGLE-LABORATORY VALIDATION OF ELISA BASED ON MONOCLONAL ANTIBODY FOR PRACTICAL OCHRATOXIN A DETECTION IN WINE

Abstract

Ochratoxin A (OTA) contamination in wine food chain is caused mainly due to ochratoxigenic *Aspergillus* sp. infection in the field, which can persist during winemaking process. The widespread exposure of such a concerning toxin lead to the establishment of very low maximum permitted levels for OTA, which demands high-performing analytical methods. Reliable highly sensitive rapid techniques are essential for detection of trace residues, where the immunoassays point out as practical screening tool. The indirect competitive ELISA (ic-ELISA) was developed for OTA detection using monoclonal antibody (mAb) produced by hybridoma OTA.1, and its performance was validated in red (RE), rose (RO) and white (WH) wine. The mAb used in immunoassay was produced in 100% H-SFM (Hybridoma Serum-Free Medium), gradually adapting hybridoma OTA.1. The ic-ELISA was standardized for mAb at a titer of 1:10,000, coupled with OTA-BSA conjugate diluted at 1:30,000, indicating high-grade of such main reagent. The validation of ic-ELISA was carried out by comparing with HPLC, based on the parameters as detection limit (0.17; 0.15 and 0.14 ng ml⁻¹ for RE, RO and WH, respectively); quantification limit (1.29; 0.91 and 0.64 ng ml⁻¹ for RE, RO and WH); accuracy (recovery rate of 90.6; 89.2 and 89.6% for RE, RO and WH), precision assessed by repeatability (RSD of 9.41; 8.01 and 9.29% to RE, RO and WH) and intermediate precision (RSD of 15.81; 12.66 and 12.65% to RE, RO and WH). The values of accuracy and precision were lower than established by European Commission. The OTA standard curve showed adequate linearity, as shown by equation $y = -15.31 \ln(x) + 58.506$, $R^2 = 0.9934$. The matrix interference (specificity) was tested in residue of dried extract of non-contaminated wine (corresponding to 5 mL of wine). No matrix interference was observed if the residue suspended in 1 mL of methanol:PBST was diluted at 1:10, independently of wine. The global uncertainty was 26, 25 and 24% for RE, RO and WH, respectively, when it was tested at 0.5 ng of OTA ml⁻¹; every three wine types showed uncertainty of 20%, when it was tested at 2.0 and 5.0 ng ml⁻¹ of OTA. Concerning the OTA analysis of 70 commercial wine samples (47 RE and 23 WH), natural contamination was detected in 14 samples (10 RE and 4 WH), with an ic-ELISA and HPLC correlation coefficient of 0.975. OTA was detected in 12 samples (8 RE and 4WH) (17.1%) by both methods. The ic-ELISA values for RE ranged from 0.26 to 0.86 ng ml⁻¹ and for HPLC ranged from 0.24 to 0.99 ng ml⁻¹. The ratio ic-ELISA/HPLC ranged of 0.87 to 1.37. Two samples (2.9%) were OTA positive (0.14 and 0.16 ng ml⁻¹) only by HPLC assay. These concentrations were below the detection limit of ic-ELISA (0.17 ng ml⁻¹). The ic-ELISA values for four WH samples ranged from 0.29 to 1.12 ng ml⁻¹, whereas HPLC detection ranged from 0.33 to 0.90 ng ml⁻¹, with ic-ELISA/HPLC ratio of 0.88 to 1.24. OTA was non-detectable in 37 RE (53%) samples and 19 WH (27%). Summarizing, the high specificity of mAb produced by hybridoma OTA.1 reaching title of 1:10,000 fill up the essential condition requested by development of biosensor, which coupled with the stable OTA-BSA conjugate at working-dilution factor of 1:30,000 by ic -ELISA, would be a promising reagent to engage into sensitive biotool. Therefore improvement on production technology concerning immunoreagents should be continued, taking to account its strategic status within the background of nanobiotechnology.

Keywords: Ochratoxin A. Immunotechnology. Wine. Validation.

1 INTRODUCTION

The ochratoxin A (OTA) contamination in wine food chain is caused mainly due to ochratoxigenic *Aspergillus* sp. infection in the field, which can persist during winemaking process (LEONG *et al.*, 2006 a). Since firstly reported in 1996, its occurrence in wine depends particularly on composition of the grape mycoflora, climate condition (temperature, humidity), and manufacturing techniques (Zimmerli & Dick, 1996, Delage *et al.*, 2003). The wine is the second largest source of OTA, which accounts with approximately 10 to 12% of intake for humans, and it is more frequently found in red wine, followed by rose and white (Brera *et al.*, 2005).

The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified this nephrotoxic, teratogenic, cytotoxic, immunotoxic, genotoxic and immunosuppressive toxin as group 2B carcinogen, i.e. carcinogenic to animals and possible human carcinogen (IARC, 1993; Kamp *et al.*, 2005). The widespread exposure of such a concerning toxin has conducted the establishment of very low maximum permitted limits for OTA, which demands high-performing analytical methods. Reliable highly sensitive rapid techniques are essential for detection of trace residues, where the immunoassays point out as practical screening tool.

The European Community monitors contamination by adopting specific guidelines for OTA in several foods, and the maximum allowed level is 2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ for all types of wine (Commission of the European Communities, 2006). Most of the countries have not established specific legislation for OTA in wine yet. In Brazil there is an ongoing public consultation (Brasil, 2009), in order to implement a Technical Regulation on Maximum Tolerated Limits for Mycotoxins in Food, suggesting 2 ng ml^{-1} for OTA in wines.

Several studies have been performed worldwide, and found highly variable levels of OTA in wines. In Europe, wines from the South and warmer regions had average contamination levels of 0.64 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in 72.3% of 635 samples analyzed, while wines from the Northern incidence of 50.3% for 835 samples and average contamination 0.18 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. In Southern Italy, where climatic conditions favor the growth of ochratoxigenic fungi, higher levels were found 7.63 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ with a higher incidence in red wine, followed by rose and white, in France concentrations between 0.01 to 0.27 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ were found while in Portugal 0.5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ for Port wine (Ratola *et al.*, 2004; Visconti *et al.*, 1999; Pietri *et al.*, 2001; Brera *et al.*, 2005; Bacaloni *et al.*, 2005).

Considering the diversity of levels of OTA contamination and the requirement of the legislation, sensitive and reliable methodologies are needed. Chromatographic methods are used in OTA analysis in different food matrices, and the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is the official methodology for quantitative OTA analysis, used with immunoaffinity column (IAC) for sample clean-up (AOAC, 1995; Visconti *et al.*; 1999, Hernández *et al.*, 2006). This methodology requires sophisticated equipment, expensive maintenance, long analysis time, qualified and trained staff, which makes routine use in the food industry.

Immunochemical methods have been an alternative in the analysis of OTA, such as ELISA, immunoaffinity and biosensores. ELISA shows high sensitivity and ease implementation, simplifying the cleaning step, but certain constituents of food matrix may affect the binding site specific of the OTA, and to validate the assay for each matrix (Scott & Trucksess, 1997; Lobeau *et al.*, 2005).

Some publications present analysis of OTA in wine by commercial kits, such as the study by Alcaide & Aguilar (2008) for validation of competitive ELISA (c-ELISA) for quantification of OTA in sweet wines. With use of immunoaffinity columns for extraction had a detection limit of 0.054 $\mu\text{g L}^{-1}$ and recoveries of OTA from spiked samples with 1 to 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ ranging from 94 to 102%. In comparison with HPLC the kit c-ELISA was more efficient to quantify OTA in the range 0.25 to 9 $\mu\text{g L}^{-1}$. Flaga *et al.* (2009) also analyzed wines by the commercial kit, but based in indirect competitive ELISA (ic-ELISA) and the liquid-liquid extraction, and found a detection limit of 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ and correlated well (90%) with HPLC.

In Brazil, few ELISA-based methods for analysis of OTA have been developed, given the difficulty in producing specific immunoreactive. Fujii *et al.* (2006) developed ic-ELISA Mab-based IgG anti-OTA, getting coffee for the analysis detection limit of 3.75 $\mu\text{g L}^{-1}$ and high correlation (90%) with HPLC.

The growing demand for regulation of maximum tolerated limits for mycotoxins by the importing countries, the importance of quality control in the wine producing chain and the dependence on imported kits for routine analysis justify the production of immunological reagents, development, standardization and validation of analytical methods applicable to Brazilian reality. Therefore, the indirect competitive ELISA (ic-ELISA) was developed for OTA detection using monoclonal antibody (mAb) produced by

hybridoma OTA.1, and its performance was validated in red (RE), rose (RO) and white (WH) wine.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 REAGENTS

The reagents used were: OTA, ovalbumin (OVA), horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (HRP-anti-IgG, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); anti-OTA.1 (63.1 % cross-reactivity for OTC in relation to OTA) and OTA-BSA (bovine serum albumin) were previously prepared and standardized (Kawamura *et al.*, 1989); 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); 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 Ochra Test (Vicam Inc., Watertown, USA) and HPLC grade acetonitrile and acetic acid (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA).

2.2 OTA STANDARD

OTA standard was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and the concentration determined by spectrophotometry (M: 403; λ : 333 nm; ϵ : 5500). Working solutions were prepared in acetonitrile: water (50:50, v/v) for HPLC and in methanol: PBST (1:9, v/v) for ic-ELISA. All chemicals used were of HPLC grade (Istituto Adolfo Lutz, 2008).

2.3 PRODUCTION OF IGG ANTI-OTA MAB

The hybridoma cell line OTA.1 secreting mAb (IgG₁ kappa isotype) specific for OTA, is derived from myeloma cell line Sp2/0-Ag14 and splenic BALB/c (Kawamura *et al.*, (1989), was prepared at Kagawa University (Japan) and was stored in fetal bovine serum (FBS) and dimethyl sulfoxide (DMSO) (FBS:DMSO, 9:1, v/v) under liquid N₂. The anti-OTA monoclonal antibody (mAb) hybridoma was grown in RPMI 1640 supplemented with

10% FBS and 2 mM L-glutamine, routinely cultured in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂. After a 2-week adaptation period, RPMI was gradually replaced with 10, 20, 30, 50, 75 and 100% Hybridoma-SFM (serum free medium, H-SFM) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine. After cell saturation (close 4 to 5 days) the cells were removed by centrifugation (2,400 x g, 10 min, 4 °C) and the supernatant was maintained at 4 °C. The mAbs were concentrated by ultrafiltration (Stirred Cell 8400, Millipore, Billerica, USA) and purified from the supernatant by ammonium sulfate precipitation (60% saturation, 390 g/l) and centrifugation (11,000 x g). The precipitates were dissolved in appropriate amounts of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.3, and then dialyzed against PBS followed by ultrapure water (Purelab Elga, Lane End, England). Immunoglobulin G (IgG) concentrations were determined by Bradford (1976) method. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the purified anti-OTA mAbs was performed according to Laemmli (1970) and the activity anti-OTA was determined by i-ELISA (Kawamura *et al.*, 1989).

2.4 OTA EXTRACTION FROM WINE SAMPLES

OTA was extracted from 5 ml wine according to Flajs *et al.* (2009), by adding 5 ml 1 M HCl and 5 ml chloroform followed by shaking at 150 rpm for 20 min (shaker MA830/Marconi ® Laboratory) and centrifuged at 2000 x g for 20 min. The chloroform extract was partitioned twice with 2 ml 0.1 M bicarbonate. The bicarbonate phase was acidified with formic acid (pH 2). After two extractions with 2 ml chloroform, the chloroform extract was evaporated in a water bath (40 °C) under nitrogen stream. The dried residue was suspended in 1.0 ml methanol: PBST (1:9, v/v), diluted 10 fold and analyzed by ic-ELISA.

2.5 OTA ANALYSIS BY IC-ELISA

The procedure was performed according to Kawamura *et al.* (1989). Polystyrene microplate (96 wells) was coated with 100 µl OTA-BSA at a dilution of 1:30.0000 (77 ng / ml, 7.7 ng/ well) in 0.1M carbonate-bicarbonate, pH 9.6 and incubated 18 h at 4 °C. After washing (four times) with 0.05% PBST, the wells were blocked with 200 µl 0.1% ovoalbumin (OVA) in PBS and incubated for 4 h at 25 °C. After washing (four times) with 0.05% PBST, 50 µl OTA standard or wine sample and 50 µl anti-OTA mAb diluted

1:10.000 (43 ng ml⁻¹, 2.15 ng / well) in PBST were added. After 18 h incubation at 4 ° C the microplate was washed four times with PBST, added to 100 µl IgG-HRP conjugate (1:1000) and incubated for 1 h at 25 ° C. New washing (four times) with PBST was carried out and 100 µl TMB were added followed by incubation for 20 min at 25° C. The reaction was blocked by adding 50 µl 1M H₂SO₄ and the absorbance was determined at 450 nm (Expert Plus, ASYS, Cambridge, UK). 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 wine sample or OTA standard and A- was the mean absorbance in their absence. The OTA concentration in the samples was determined using a standard curve (0.1 to 10 ng OTA/ml in methanol: PBST, 1:9, v/v), plotting the percentage binding against the log of OTA amount.

2.6 OTA ANALYSIS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

OTA was analyzed according to Vicam manual (2005) with modifications. An aliquot of 10 ml wine were added to 10 ml 1% PEG + 5% NaHCO₃, pH 8.3. The mixture was shaker and filtered through a glass filter. Afterwards, 10 ml the mixture was passed slowly through the CIA-Ochra Test (Vicam). The CIA was washed with 5 ml of solution NaCl 2.5% + 0.5% NaHCO₃ and then with 5 ml of ultra pure water. OTA was eluted with 2 ml methanol and the eluate dried under nitrogen stream. The residue was suspended in 200 µl mobile phase (acetonitrile:water:acetic acid (99:99:2, v/v/v) pH 3.2 and 20 µl injected into the HPLC system (isocratic reverse phase) (LC-10AT VP pump, fluorescence detector RF-10A, Shimadzu, Japan) with Nucleosil 100 C₁₈ column (5 µ m, 4 x 250 mm, Merck, Germany). Excitation and emission wavelengths were 335 and 475 nm, respectively and the mobile phase flow rate was 0.8 ml/min. The concentration of the samples was determined using a standard curve (5 to 100 ng of OTA/ml in acetonitrile:water 1:1, v/v).

2.7 INTRA-LABORATORY VALIDATION FOR IC-ELISA

The intra-laboratory validation for ic-ELISA was performed in comparison with HPLC based on the following parameters: accuracy, precision, detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), linearity, specificity and the maximum standard uncertainty. Determination accuracy was assessed by OTA recovery test from three determinations in triplicate for ic-ELISA and two determinations for HPLC for red, rose and white wine samples, in which OTA was not detected (concentration < 0.042 ng ml⁻¹ for red wine, <0.036 ng ml⁻¹ for rose and <0.033 ng ml⁻¹ for white wine analyzed by HPLC). There was a pool of different matrices for red wine (Isabel, Bordeaux, Cabernet Sauvignon and Merlot) rose (Bordeaux and Isabel) and white wine (Chardonnay, Muscat and Niagara), to better evaluate the interference of the components in ic-ELISA and HPLC. The samples were spiked in order to obtain concentrations of 0.5, 1, 2 and 5 ng ml⁻¹ wine. After one day, samples were extracted for HPLC and ic-ELISA determination (Anvisa, 2003, Commission of the European Communities, 2006).

Precision was assessed by repeatability and intermediate precision, based on RSD (%). Repeatability was evaluated by one determination (one extraction) of each concentration (0.5, 2 and 5 ng ml⁻¹) analyzed in seven replicates at the same day. Intermediate precision was evaluated by three determinations (three extractions) on three different days from three concentrations (0.5, 2 and 5 ng ml⁻¹), in seven replicates (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007; Commission of the European Communities, 2006).

The LOD for HPLC was calculated as 3-fold standard deviation (SD) and LOQ as 5-fold SD for each food matrix. The SD was obtained from seven replicates of each matrix (red, rose and white wine) artificially spiked with 0.1 ng OTA ml⁻¹, in which OTA was not detected, and showed no peak by HPLC analysis. For ic-ELISA, LOD by the formula $LOD = \text{mean} - 3 \times SD$ and LOQ by the formula $LOQ = \text{mean} - 5 \times SD$. The mean and SD were obtained from seven replicates of the blank of each matrix, with no detected OTA (Iijima *et al.*, 1996, Inmetro, 2007).

Specificity was evaluated by interference of each matrix without contamination. For HPLC, the chromatograms were evaluated by observing whether interfering peaks appeared in the same retention time as OTA (approximately 9 min) and for ic-ELISA the proportion of interference by each matrix in the test. The linearity was evaluated according to the regression equations of seven calibration curves of OTA (for a month)

obtained from seven points for ic-ELISA and six points for HPLC, and depending on the coefficients of determination and level of significance (Statistica 7.0, Tulsa, USA).

The correlation coefficient (R) between ic-ELISA and HPLC was calculated by comparing the OTA concentrations in naturally contaminated wine samples by Pearson correlation test (software Statistica 7.0, Tulsa, USA) and the maximum standard uncertainty for ic-ELISA and HPLC was determined by the formula: $U_f = \sqrt{(\text{LOD}/2)^2 + (\alpha \times C)^2}$, where U_f is the maximum standard uncertainty ($\mu\text{g kg}^{-1}$), LOD is detection limit ($\mu\text{g kg}^{-1}$), α is a numerical factor whose value depends on the value of C, which is the concentration of interest ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (Commission of the European Communities, 2006; ANVISA (Brasil, 2009).

3 RESULTS AND DISCUSSION

In this study was performed intra-laboratory validation of ic-ELISA developed and standardized in a previous study, which were determined optimal dilution of OTA-BSA conjugate of 1:30.000 (77 ng ml⁻¹, 7.7 ng/well) titer of anti-OTA mAb IgG 1:10.000 (43 ng ml⁻¹, 2.15 ng/ well) and secondary antibody IgG-HRP 1:1.000. The parameters accuracy, precision, LOD, LOQ, linearity, specificity and uncertainty maximum standard were analyzed in comparison with HPLC official method recommended for OTA analysis.

Study on matrix interference of red, rose and white wine was carried out (Figures 1 and 2) to determine the parameter selectivity/specificity, and this is the first step in the development and validation of a method should be continuously re-evaluated. In the standardization of an immunoassay used for food analysis it is essential to evaluate the influence of the components of each matrix, taking into account that the test is based on antigen-antibody (Ag-Ab) interaction, and there may cross-react with compounds present in the matrix. Regarding the composition of wine, there are many variations as there are many different types and a wide variety of grapes that can be used in manufacturing, in combination or individually. Thus, the wine composition varies greatly depending on the variety, the winemaking and aging time.

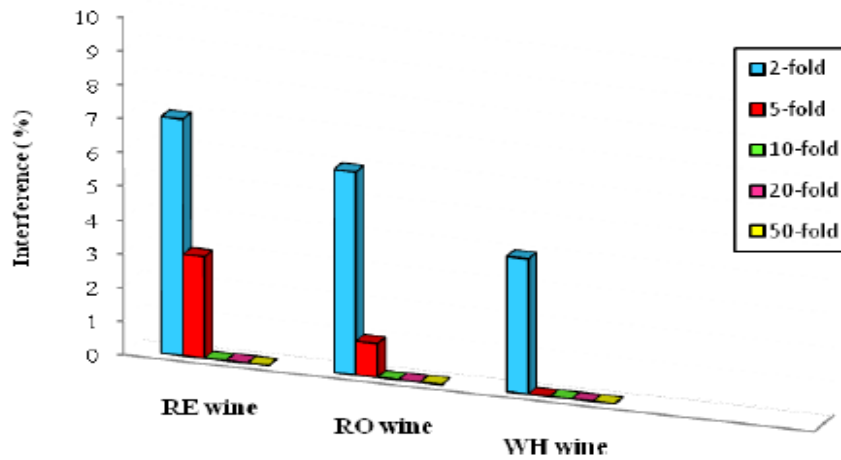


Figure 1 – Matrix interference in ic-ELISA for OTA determination of RE wine pool (Isabel, Bordeaux, Cabernet Sauvignon and Merlot) RO pool (Bordeaux and Isabel) and WH pool (Chardonnay, Muscat and Niagara), in which OTA was not detected by HPLC. The dried residue after extraction corresponding of 5 ml of each pool was suspended in 1 ml and diluted 1:2; 1:5; 1:10, 1:20 e 1:50- fold in methanol: PBST 1:9, v/v prior to ic-ELISA.

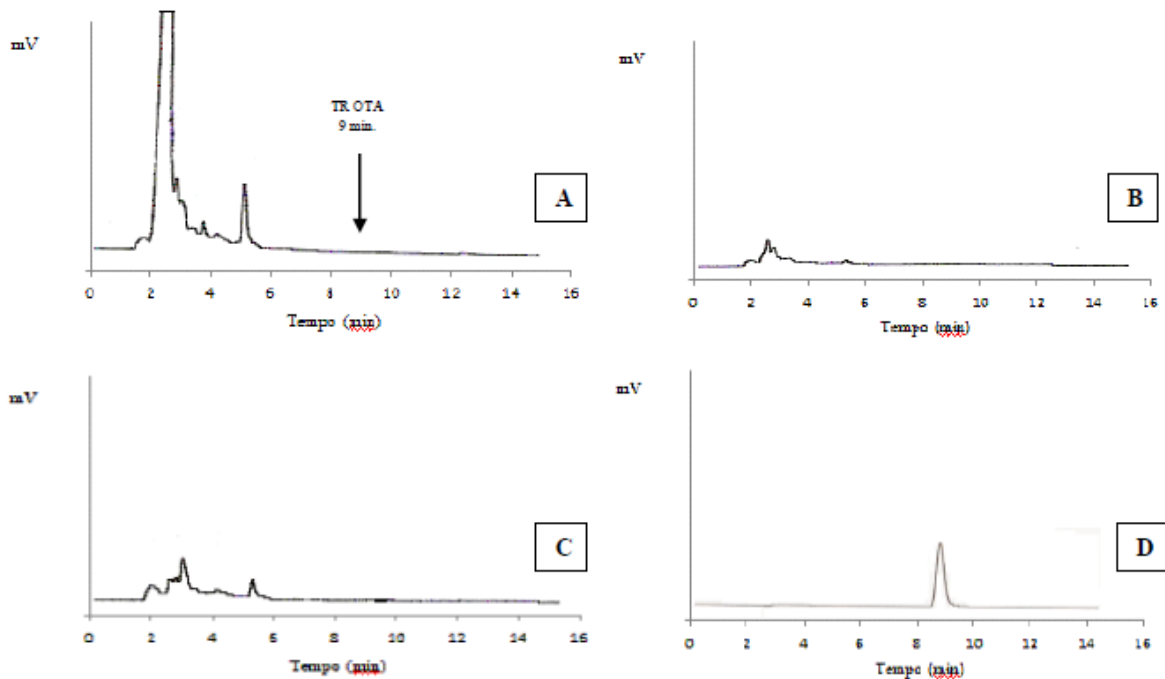


Figure 2 – Matrix interference of RE wine pool (Isabel, Bordeaux, Cabernet Sauvignon and Merlot) RO pool (Burgundy and Isabel) and WH pool (Chardonnay, Muscat and Niagara) on OTA determination by HPLC. **A:** pool RE wine; **B:** pool RO wine; **C:** pool WH wine; **D:** OTA standard (10 ng ml⁻¹). The dried residue, corresponding to 5 ml of negative matrix for OTA, was suspended in 200 µL of acetonitrile/water/acetic acid (99:99:2).

The main compounds in grapes are the phenolics found in large amounts and contribute to the organoleptic properties, especially color, astringency, and bitterness. There are two groups of flavonoids (anthocyanins, flavonoids, flavonols and dihydroflavonols), and non-flavonoids (phenolic acids and hydroxybenzoic acid and its derivatives, stilbenes and phenolic alcohols). During the process of maturation and aging of wine the composition will be changed such that the anthocyanin concentration has decreased by taking part in reaction to the formation of more stable pigments (Monagas *et al.*, 2005). Thus, standardization and validation of a new immunochemical method, or the application of an existing method for other matrices, require assessment of each matrix effect.

In Brazil, among other grape varieties, the Isabel has been extensively used for red and rose wine making. A study on the composition of red wine from this variety, showed the presence of several phenolic compounds, thirty anthocyanins, two vitisin, ten-hydroxy-phenyl piroantocianins and thirteen flavonols (Nixdorf & Gutiérrez, 2010).

In study, different wine samples were extracted and analyzed by HPLC in order to obtain uncontaminated matrices to carry out the intra-laboratory validation of ic-ELISA. There was a pool of different matrices for red wine (Isabel, Bordeaux, Cabernet Sauvignon and Merlot) rose (Bordeaux and Isabel) and white wine (Chardonnay, Muscat and Niagara), to better evaluate the interference of the components in ic-ELISA and HPLC.

OTA is usually extracted with acidified organic solvents and sample clean-up can be performed by liquid-liquid separation, and using sodium bicarbonate (VALENTA, 1998). In this ic-ELISA, was used liquid-liquid extraction, and the wine samples were acidified and extracted with chloroform and then this phase was washed with sodium bicarbonate solution and again extracted with chloroform. After extraction, the dried residue was suspended in 1.0 ml of methanol: PBST (1:9, v/v) and diluted (1:2, 1:5, 1:10, 1:20 and 1:50) prior to application on the microplate. The technique was efficient for OTA determination from RE, RO and WH wine. Figure 1 shown that matrix interference occurred at 1:2 dilution for all the wines, i.e, 7% for red, 6% for rose and 4% for white wine. At 1:5 dilution, interference was 3% and 1% for red and rose and there was no interference for white wine. At 1:10 dilution there was no interference from any of the matrices. Therefore, it was established that after extraction of 5.0 ml wine, the dried residue should be suspended in 1.0 ml and diluted 1:10 in methanol: PBST 1:9, v/v prior to ic-ELISA.

Fujii *et al.* (2006) analyzing OTA in coffee by ic-ELISA reported that 1:100 dilution of the sample was required in order to reduce the matrix interference, which ratifies

the need for standardizing the method for different matrices. For HPLC, samples were extracted by CIA Ochra Test, and the dried residue suspended in acetonitrile: water: acetic acid (99:99:2, v/v/v). Figure 2 shows the chromatograms A, B and C, obtained from the matrix of RE, RO and WH wine, with no detectable OTA (concentration below the LOD of 0.042 ng ml⁻¹ for RE; 0.036 ng ml⁻¹ for RO and 0.033 ng ml⁻¹ for WH wine). The chromatogram D was obtained for OTA standard (10 ng ml⁻¹). The LOQs for HPLC were 0.07 ng ml⁻¹ for RE wine, 0.06 ng ml⁻¹ for RO and 0.055 ng ml⁻¹ for WH, while for ic-ELISA were 0.32 ng ml⁻¹ for RE, 0.27 ng ml⁻¹ for RO and 0.23 ng ml⁻¹ for WH wine.

The linearity for HPLC and ic-ELISA was assessed by the calibration curve of OTA standards. For ic-ELISA, the calibration curve consisted of seven points, with concentration ranging from 0.1 to 10.0 ng ml⁻¹ (Figure 3) and the regression equation was $y = -15.31 \ln(x) + 58.506$ and the $R^2 = 0.9934$ ($p < 0.05$). The LOD was 0.17, 0.15 and 0.14 ng ml⁻¹ for RE, RO and WH wine respectively. For HPLC, the calibration curve was made with 6 points, with concentrations ranging from 5 and 100 ng/ml. The regression equation was $y = x \cdot 3.4006 - 1.3077$, and $R^2 = 0.9998$ ($p < 0.01$). These results confirm the linearity of the methods evaluated.

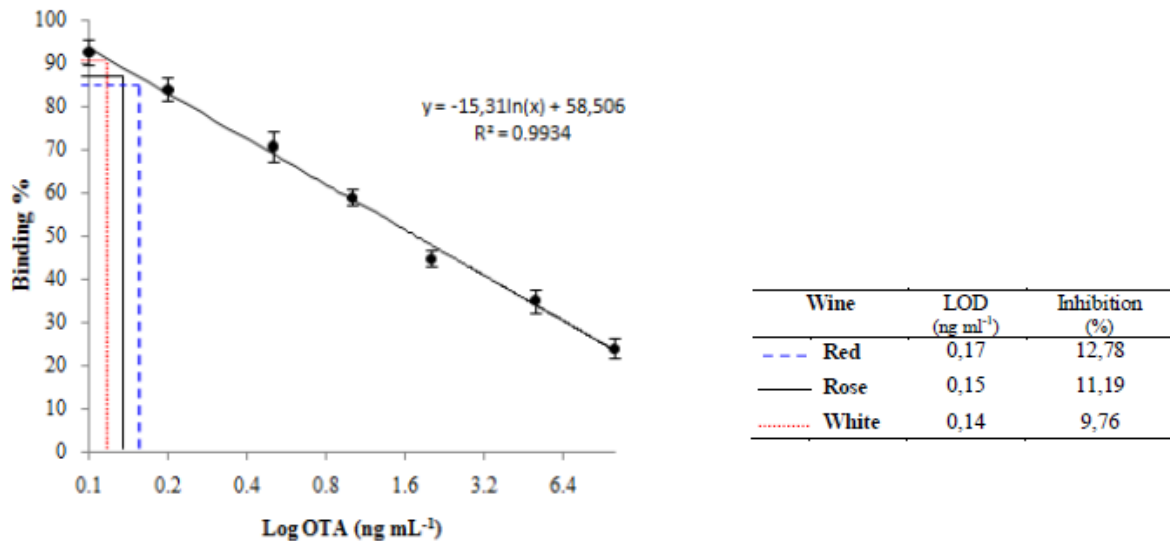


Figure 3 – Standard curve for OTA detection by ic-ELISA. Circles represent the mean binding from seven standard curves performed on different days over a 1-month period. Bars represent standard deviations. The detection limit was 0.17 ng.ml⁻¹ for RE wine, 0.15 ng.ml⁻¹ for RO wine and 0.14 ng.ml⁻¹ for WH wine, which was the minimum concentration over (12.78, 11.19 and 9.76 %, for RE, RO and WH wine) inhibition (mean minus 3-fold SD of 0 ng ml⁻¹ OTA) detected by ic-ELISA (Iijima *et al.*, 1996).

The OTA recovery rates from RE wine, RO and WH, allowed to evaluate the accuracy of the ic-ELISA and HPLC methods (Table 1). The samples were spiked with OTA from 0.5 to 5 ng ml⁻¹. The recovery rates by ic-ELISA for RE wine ranged from 77 to 94% (mean 85.0%); from 77 to 94% (mean 83.25%) for RO and from 80 to 96 % (mean 86.25%) for WH wine. For HPLC, the recovery rates ranged from 70 to 94% with mean of 79.25% for RE wine, from 73 to 96% (mean 81.75%) for RO and from 76 to 100% (mean 86,25%) for WH wine. Similar results (72.5 to 80.5%) were reported for OTA recovery in wines spiked from 0.05 to 1.0 ng ml⁻¹ (Serra *et al.*, 2004).

Table 1 – Accuracy of HPLC and ic-ELISA evaluated through OTA recovery from pool of spiked red, rose and white wines

Wine	OTA added (ng.ml ⁻¹)	Recovery**					
		CLAE			ic-ELISA		
		%	RSD	mean±SD	%	RSD	mean±SD
Red	0.5	94±3.16	3.36	79.25±10.69	94±2.83	3.01	85.0±6.98
	1	73±2.82	3.86		77±0.71	0.92	
	2	80±1.40	1.75		85±0.71	0.83	
	5	70±2.63	3.76		84±6.07	6.37	
Rose	0.5	96±2.98	3.10	81.75±10.72	94±2.83	3.01	83.25±7.45
	1	73±3.10	4.24		77±6.36	8.25	
	2	84±2.78	3.30		82±3.54	4.31	
	5	74±1.21	1.63		80±7.63	9.53	
White	0.5	100±5.88	5.88	84.25±10.90	96±5.65	5.88	86.25±7.14
	1	76±1.93	2.53		82±8.48	10.34	
	2	83±1.63	1.96		87±4.95	5.69	
	5	78±2.66	3.41		80±2.54	3.17	

* Critical values for recovery (%) according to the Commission of the European Communities (2006): < 1 ng.ml⁻¹ of OTA= 50–120%; 1- 10 ng.ml⁻¹ = 70–110%.** Each result represents the mean ±SD of six determinations for ic-ELISA (duplicate extraction and triplicate analysis) and four determinations for HPLC (duplicate extraction and duplicate analysis).

According to the Commission of the European Communities (2006), recovery for contamination lower than 1 ng ml⁻¹ should be between 50-120% and for contamination between 1 and 10 ng ml⁻¹, recovery between 70 to 110%. The recovery rates for both the ic-ELISA and HPLC were within the recommended range, therefore these methodologies showed accuracy. In this study the recovery correlation analysis ic-ELISA/CLAE shows the efficiency of ic-ELISA with a correlation coefficient R: 0.929, compared with HPLC.

The applicability of ic-ELISA for OTA analysis in wine samples acquired from local market and wineries was compared with HPLC (Table 2). This study included 70 samples, 47 RE and 23 WH wines. OTA natural contamination was detected in 14 samples (10 RE and 4 WH). OTA was detected in 12 samples (8 RE and 4 WH) (17.1%) by both methods. The ic-ELISA values for RE ranged from 0.26 to 0.86 ng ml⁻¹ (mean level of 0.42 ng ml⁻¹) and for HPLC ranged from 0.24 to 0.99 ng ml⁻¹ (mean of 0.38 ng ml⁻¹). The ratio ic-ELISA/HPLC ranged of 0.87 to 1.37. Two samples (2.9%) were OTA positive (0.14 and 0.16 ng ml⁻¹) only by HPLC assay. These concentrations were below the detection limit of ic-ELISA (0.17 ng ml⁻¹). The ic-ELISA values for four WH samples (5.7%) ranged from 0.29 to 1.12 ng ml⁻¹ (mean of 0.68 ng ml⁻¹) whereas HPLC detection ranged from 0.33 to 0.90 ng ml⁻¹ (mean of 0.58 ng ml⁻¹) with ic-ELISA/HPLC ratio of 0.88 to 1.24. OTA was non-detectable in 37 RE (53%) and 19 WH (27%) wine samples.

OTA was not detected in 37 (53%) wine samples by HPLC and in 39 (55.9%) samples by ic-ELISA. The occurrence of false negative samples by ic-ELISA does not invalidate the immunoassay, since the detection limit was much lower than the maximum allowed limit (2 ng ml⁻¹) (Commission of the European Communities, 2006).

Observed (Table 2) that the 14 samples positive for OTA, ic-ELISA detected higher value in 9 (64%) samples, while HPLC detected value greater than ic-ELISA in 5 (36%). In general, immunoassay may overestimate the concentrations when compared with HPLC, which can be explained taking into consideration that loss analyte may occur in the pre-cleaning HPLC and to immunoassay interference of some component of the matrix can occur either by steric effect, or by competition for binding site Ab (Pestka *et al.*, 1995; Ono *et al.*, 2000). This fact does not affect the applicability of this ic ELISA based in mAb IgG anti-OTA to screening of OTA in wine, adding further advantages such as high sensitivity, simplicity, use of smaller volumes of organic reagents and higher volumes of buffer, possibility analysis of large numbers of samples which reduces the cost of analysis.

Three wine samples detected by ic-ELISA showed concentrations below the LOQ (0.32 ng ml⁻¹), and with a concentration of 0.26 and two with 0.29 ng ml⁻¹ (Table 2). Nevertheless, high correlation between HPLC and ic-ELISA data for naturally contaminated RE and WH wine sample was achieved with correlation coefficient of 0.975 (Figure 4), demonstrated the applicability of ic-ELISA standardized for OTA analysis in wine. Flagg *et al.* (2009) analyzed OTA in musts and wines using a commercial kit, and reported a correlation coefficient of 0.821 which was lower than that shown in this work.

Parameter precision was also evaluated through the repeatability and intermediate precision, in terms of RSD (%). Repeatability evaluates the concordance of results within a short period of time (Anvisa, 2003), and intermediate precision indicates the effect of variations in the laboratory, resulting from different days or different analysts and different equipment, and is considered more representative of the result variability (International Conference on Harmonisation, ICH, 1995).

Table 2 – Comparative study for OTA analysis in naturally contaminated red and white wine samples by ic-ELISA and HPLC.

Wine	ic-ELISA- HPLC (OTA detection)	ic-ELISA/ HPLC (ratio)	samples n° (%)	OTA ng ml ⁻¹ *			
				ic-ELISA		HPLC	
				Positive samples	Range (mean)	Positive samples	Range (mean)
Red (47)	ND-ND		37 (53.0)	ND		ND	
	ND-D		2 (2.9)	ND ND		0.14±0.20 0.16±0.26	
	D-D	1.08	8 (11.4)	0.26±0.12	0.26 - 0.86 (0.42)	0.24±0.06	0.24 - 0.99 (0.38)
		1.16		0.29±0.20		0.25±0.10	
		1.16		0.29±0.18		0.25±0.10	
		1.30		0.35±0.10		0.27±0.03	
		1.24		0.36±0.32		0.29±0.01	
		1.30		0.39±0.40		0.30±0.02	
		1.37		0.56±0.10		0.41±0.20	
		0.87		0.86±0.22		0.99±0.08	
White (23)	ND-ND		19 (27.0)	ND		ND	
	D-D	0.88	4 (5.7)	0.29±0.40	0.29 - 1.12 (0.68)	0.33±0.14	0.33 - 0.90 (0.58)
		1.23		0.48±0.16		0.39±0.12	
		1.18		0.84±0.25		0.71±0.07	
		1.24		1.12±0.10		0.90±0.02	

* Each result represents the mean ±S D of six determinations to ic-ELISA (duplicate extraction and triplicate analysis) and four determinations to HPLC (duplicate extraction and duplicate analysis); ic-ELISA= LOD (red wine: 0.17 ng ml⁻¹; white: 0.14 ng ml⁻¹); LOQ (red wine: 0.32 ng ml⁻¹; white: 0.23 ng ml⁻¹); HPLC= LOD (red: 0.042 ng ml⁻¹; white: 0.033 ng ml⁻¹); LOQ (red: 0.07 ng ml⁻¹; white: 0.055 ng ml⁻¹); D= detected; ND= not detected. 90 0.10.20.30.40.50.60.70.80.91.01.1.ic-ELISA (ng mL⁻¹)-0.20.00.20.40.60.81.01.2HPLC (ng mL⁻¹).

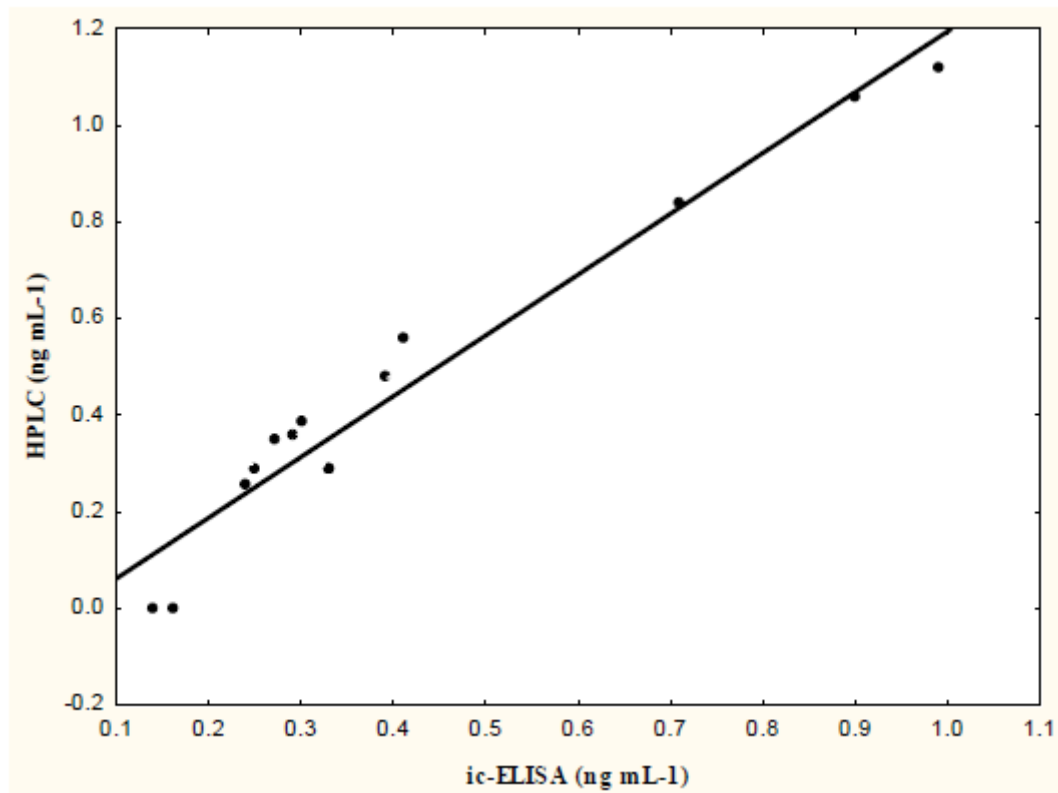


Figure 4 – HPLC and ic-ELISA correlation for OTA determination in positive red and white wine samples (n=14). x and y axis correspond to OTA concentration (ng ml⁻¹) determined independently by ic-ELISA and HPLC, respectively. Correlation coefficient (0.975) was calculated by linear regression equation ($y = 0.0642x + 1.2590$).

Precision analysis for ic-ELISA and HPLC are shown in Table 3. The repeatability for ic-ELISA showed higher RSD when compared to HPLC for RE, RO and WH wines at three concentrations (0.5, 2 and 5 ng ml⁻¹). The lowest RSD found for ic-ELISA was 6.06% for WH wine (2 ng ml⁻¹) and the highest was 11.85% (5 ng ml⁻¹). For HPLC the lowest RSD was 1.46% found for RO wine (5 ng ml⁻¹) and the highest was 3.62% for WH wine (0.5 ng ml⁻¹). Even though ic-ELISA showed higher RSD than HPLC, values were lower than those determined by the Commission of the European Communities (2006), which allows the value of RSD $\leq 40\%$ for OTA levels < 1 ng ml⁻¹ and $\leq 20\%$ for levels between 1 and 10 ng ml⁻¹ in OTA repeatability conditions. In a study performed for evaluation of two commercial kits for c-ELISA (competitive ELISA), was found RSD of 7.3 and 5.7% for repeatability (Angeline *et al.*, 2008), close to the values found in this study.

As for the intermediate precision for ic-ELISA the lowest RSD was 9.84% found for WH wine (2 ng ml⁻¹) and the highest for red wine, 18.84% (0.5 ng ml⁻¹). As for

HPLC smaller RSD was 4.42% for RO wine (5 ng ml⁻¹) and greater than 8.22% for RE wine (0.5 ng ml⁻¹).

The maximum standard uncertainty, associated with the analytical results was calculated as follows: $U_f = \sqrt{(LD/2)^2 + (\alpha \times C)^2}$ (Commission of the European Communities, 2006). This parameter is a variability measurement and the consequent reliability of the analytical method, which combines the individual contributions of all the error sources. For ic-ELISA, in the concentration of 0.5 ng ml⁻¹ uncertainty for RE, RO and WH wine was respectively 26, 25 and 24% and to 2 and 5 ng ml⁻¹ was 20% for the three matrices. HPLC for the uncertainty was 20% for the three concentrations (0.5, 2 and 5 ng ml⁻¹) and for the three matrices studied. Ratola *et al.* 2004 found 70% of uncertainty for concentrations of OTA below 0.5 ng ml⁻¹ and 37% for higher levels. These values represent an obstacle when the focus is food security, confirming the difficulty of obtaining analytical precision which reinforces the need to validate the methodology against different food matrices.

Table 3 – Precision analysis under repeatability and intermediate precision conditions of the ic-ELISA and HPLC method for OTA analysis.

Wine	OTA (ng ml ⁻¹)	Repeatability RSD _r (%)				Intermediate precision RSD _R (%)			
		HPLC	Mean	ic-ELISA	Mean	HPLC	Mean	ic-ELISA	Mean
Red	0.5	2.84		9.94		8.22		18.84	
	2	1.50	2.35	9.60	9.41	6.69	7.19	13.17	15.81
	5	2.70		8.68		6.67		15.43	
Rose	0.5	2.20		8.18		2.80		13.88	
	2	2.92	2.19	8.51	8.01	5.42	4.21	11.27	12.66
	5	1.46		7.35		4.42		12.85	
White	0.5	3.62		9.96		6.24		14.23	
	2	1.80	2.73	6.06	9.29	4.48	5.21	9.84	12.65
	5	2.78		11.85		4.91		13.87	

RSD: Relative Standard Deviation.

Critical values RSD_r (%) according to the Commission of the European Communities (2006): < 1 ng ml⁻¹ of OTA ≤ 40%; 1 and 10 ng ml⁻¹ of OTA is ≤ 20% to repeatability.

CONCLUSION

National production of immunoreagents and development, standardization and validation of analytical methods applicable to national reality is necessary. This ic-ELISA developed can be applied for screening of OTA in RE, RO and WH, and showed good correlation with HPLC ($R=0.975$) and advantages as simplicity, sensitivity, specificity, using lower quantities of solvents, facility of implementation, and evaluation capacity of a large number of samples. Also stands out that the high specificity of mAb IgG produced by hybridoma OTA.1 reaching title of 1:10,000 fill up the essential condition requested by development of biosensor and others bio tools. Therefore improvement on production technology concerning immunoreagents should be continued, taking to account the context of nanobiotechnology in order to minimize dependence on imports and the current cost of implementing the quality control of agricultural products.

Acknowledgements

Financial support: Araucária Foundation, CNPq (the Brazilian Government Organization for grant aid and fellowship to Brazilian students and researchers), CNPq-MAPA/SDA – Ministry of Agriculture, Nanobio/CAPES – Ministry of Education, Paraná Fund/SETI (Paraná state grant).

5.3 COLUNA DE IMUNOAFINIDADE BASEADA EM AFFI-GEL IMOBILIZADO COM ANTI-OCRATOXINA MONOCLONAL PARA MONITORAMENTO DE OTA EM VINHO

Resumo

Coluna de imunoafinidade (CIA) baseada em anticorpo monoclonal (AcM) destaca-se na limpeza e concentração de ocratoxina A (OTA) em alimento, devido a alta especificidade e recuperação em matrizes complexas. CIA baseada em suporte ativado Affi-Gel 10 foi desenvolvida com AcM IgG produzido por hibridoma OTA.1, procedendo adaptação gradual de cultivo no meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, a 100% de meio H-SFM (*Hybridoma-Serum Free Medium*). O AcM produzido caracterizou-se perante reação cruzada com os análogos, sendo 63,1 %, com OTC; 0,63% com OTB; 0,06 % com OT α e 1,19 % com 4-hidroxi-OTA. As CIAs foram confeccionadas com 5 e 10 mg de IgG/mL de gel, misturando AcM produzido em 75 e 100% H-SFM (proporção 1:1) e, denominadas de CIA 5 e CIA 10, respectivamente. A eficiência de CIA 5 e 10 foi comparada perante retenção de OTA na faixa de 0,5 a 15 ng em tampão PBS-bicarbonato de sódio a 1 % e, o eluato analisando por CLAE. Considerando a similaridade na taxa de retenção destas CIAs ($p < 0,05$), elegeu-se a CIA 5 para prosseguir a validação intra-laboratorial, comparando com CIA comercial. Avaliou-se a taxa de recuperação de OTA em vinho tinto (VT) artificialmente contaminado (0,5, 2 e 5 ng/mL de OTA), detecção de OTA em vinhos naturalmente contaminados e reutilização de coluna. Avaliando vinho artificialmente contaminado, a CIA 5 recuperou 80,5; 76,87 e 76,75% em relação a CIA comercial com 76,85; 86,14 e 84,97 %, respectivamente para VT contaminado com 0,5; 2; 5 ng de OTA/mL, ocorrendo diferença significativa entre as colunas, apenas para 2 ng de OTA/mL ($p < 0,05$). Estendendo o teste de aplicabilidade da CIA desenvolvida para 14 amostras naturalmente contaminadas (10 VT e 4 vinho branco-VB), CIA 5 e CIA comercial apresentaram correlação R de 0,954. A limpeza de VT com CIA 5 permitiu a detecção de 0,12 a 0,91 ng/mL de OTA (média de 0,35 ng/mL), em relação a 0,14 a 0,99 ng/mL (média de 0,34 ng/mL) com CIA comercial. A limpeza de VB com CIA 5 detectou 0,33 a 0,90 ng/mL de OTA (média de 0,58 ng/mL) e, CIA comercial de 0,37 a 1,12 ng/mL (média de 0,62 ng/mL). A regeneração de coluna visando reuso foi avaliada, procedendo cinco determinações consecutivas em vinho artificialmente contaminado com 0,5; 2 e 5 ng/mL de OTA. A CIA 5 permitiu reuso em VT por até três análises sequenciais, sendo que para 0,5 ng de OTA/mL, a coluna recuperou 80,50; 78,97 e 78,30 % para primeiro, segundo e terceiro uso, respectivamente; 76,87; 74,45 e 70,75% para 2 ng de OTA/mL e 76,75; 74,37 e 68,55% para 5 ng de OTA/mL. A CIA comercial permitiu três usos para 0,5 ng de OTA/mL (recuperação de 76,85; 73,15 e 68,10%, respectivamente), mas apenas um ou dois usos para 2 e 5 ng de OTA/mL. A tecnologia de produção de CIA nacional baseada em suporte Affi-Gel é viável desde que condições ideais de confecção sejam estabelecidas, com enfoque na produção de AcM de alta especificidade, visando atender a demanda exigida pelo controle de qualidade de vinho.

Palavras – chave: Coluna de Imunoafinidade. Suporte Affi-Gel. Ocratoxina A. Vinho.

AFFI-GEL IMMUNOAFFINITY COLUMN IMMOBILIZED WITH MONOCLONAL ANTI-OCRATOXIN INTENDED FOR OTA MONITORING IN WINE

Abstract

Immunoaffinity columns (IAC) based on monoclonal antibodies (mAbs) are noted in the cleaning and concentration of ocratoxina A (OTA) in food, due to their high specificity and recovery in complex matrices. IAC based on support activated Affi-Gel 10 was developed with IgG mAb produced by hybridoma OTA.1, proceeding gradually adaptation of cultivation in RPMI with 10% fetal bovine serum, until 100% of medium H-SFM (Hybridoma Serum-Free Medium). The mAb produced was characterized for cross react with analogues, being 63.1% with OTC, 0.63% with OTB, 0.06% with OT α and 1.19% with 4-hydroxy-OTA. The CIAs were prepared with 5 and 10 mg of IgG / mL gel, mixing mAbs produced in 75 and 100% H-SFM (proportion 1:1) and called CIA 5 and CIA 10, respectively. The efficiency of CIA 5 and 10 was compared for OTA retention in the range of 0.5 to 15 ng in PBS-sodium bicarbonate at 1%, and the eluate analyzed by HPLC. Considering the similarity in the retention rate of these CIAs ($p < 0.05$), the IAC 5 was chosen to proceed the intra-laboratory validation by comparing with IAC commercial. Was evaluated the recovery rate of OTA in red wine (RE) artificially contaminated (0.5 to 5 ng of OTA ml⁻¹); detection of OTA in naturally contaminated wine and reusing column. Assessing spiked wine, the IAC 5 recovered 80.5; 76.87 and 76.75% compared to IAC commercial with 76.85; 86.14 and 84.97% respectively for spiked RE with 0.5, 2 and 5 ng OTA ml⁻¹, although there was no significant difference between columns ($p < 0.05$). Extending the applicability of test for IAC developed for 14 naturally contaminated samples (10 RE and 4 white wine-WH), IA 5 and IAC commercial showed correlation of $R = 0.954$. The cleaning of RE with IAC 5 allowed detection from 0.12 to 0.91 ng ml⁻¹ of OTA (average 0.35 ng ml⁻¹) for 0.14 to 0.99 ng ml⁻¹ (average 0.34 ng ml⁻¹) with IAC commercial. The cleaning of WH with IAC 5 detected 0.33 to 0.90 ng ml⁻¹ of OTA (average 0.58 ng ml⁻¹) and IAC commercial of 0.37 to 1.12 ng ml⁻¹ (average 0, 62 ng ml⁻¹). The column regeneration was evaluated in order to reuse, carrying five consecutive determinations in spiked RE with 0.5, 2 and 5 ng ml⁻¹ of OTA). The IAC 5 allowed reuse in RE for up to three sequential analysis being that for 0.5 ng OTA ml⁻¹, the column recovered 80.50, 78.97 and 78.30% for first, second and third use, respectively; 76.87, 74.45 and 70.75% for 2 ng of OTA ml⁻¹ and 76.75, 74.37 and 68.55% for 5 ng OTA ml⁻¹. The IAC commercial allowed three uses to 0.5 ng OTA ml⁻¹ (recovery of 76.85, 73.15 and 68.10%, respectively), but only one or two uses for 2 and 5 ng OTA ml⁻¹. The technology of production of national IAC based on Affi-Gel support is feasible provided that ideal conditions for production are established, focusing on the production of mAbs with high specificity, to meet the demand required by the quality control of wine.

Keywords: Immunoaffinity column. Affi-Gel support. Ocratoxin A. Wine.

1 INTRODUÇÃO

Ocratoxina A (OTA) é micotoxina produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, com efeitos nefrotóxico, teratogênico, citotóxico, genotóxico e potencialmente carcinogênico (IARC, 1993; FINK-GREMMELS *et al.*, 1995; KAMP *et al.*, 2005). Sendo OTA encontrada naturalmente em uvas, legislações cada vez mais exigentes têm sido adotadas. A Comunidade Européia adota regulamentação propondo nível máximo tolerado de 2 µg/L para todos os tipos de vinho, bebidas à base de mosto de uvas, suco de uva, suco de uva como ingrediente em outras bebidas, incluindo néctar de uva e suco concentrado e reconstituído de uva, destinado ao consumo humano direto (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2006). No Brasil está em andamento implantação de Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados, iniciado com Consulta Pública (nº 100, de 21 de dezembro de 2009), que sugere limite de 10 µg/L para OTA em vinhos.

Assim, monitoramento contínuo tem sido o procedimento recomendado no controle de qualidade. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada à coluna de imunoafinidade (CIA), proporciona limpeza eficiente de interferentes e, tem sido a metodologia recomendada para análise quantitativa de OTA, conforme *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC, 1995; VISCONTI *et al.*, 1999; GILBERT & ANKLAM, 2002; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

O bom desempenho de uma CIA proporcionando separação eficiente do analito de outros compostos da matriz, está relacionado à qualidade do anticorpo (Ac) imobilizado, sua especificidade, avidéz, reatividade cruzada, bem como com a quantidade de anticorpo que consegue imobilizar. A escolha do suporte sólido utilizado é importante, o qual deverá apresentar alta capacidade de ligação e ao mesmo tempo evitar ligações inespecíficas. Deve ser química e biologicamente inerte, facilmente ativado, mecanicamente estável e com partículas de tamanho adequado. Sua reatividade é diretamente dependente da orientação da imobilização do Ac, bem como do método de ativação da matriz e do grupo reativo disponível no Ac para o acoplamento. Podem ser constituídos de polissacarídeos como celulose, agarose, *Sepharose* (PFEIFFER *et al.*, 1987; WIMALASENA & WILSON, 1991; RHEMREV-BOOM *et al.*, 2001; SHELVER *et al.*, 2002).

As CIAs utilizam grande quantidade de IgG o que eleva o custo para sua produção, o qual poderia ser minimizado por regeneração das colunas com reutilização sem

perda significativa na atividade (SCOTT & TRUCKSESS, 1997; WATANABE *et al.*, 2001; KONDO *et al.*, 2002).

Algumas micotoxinas têm sido analisadas em diferentes matrizes utilizando-se CIA a exemplo de OTA em café (SIBANDA *et al.*, 2002), vinho (DALL'ASTA *et al.*, 2004), cerveja (VISCONTI *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) e zearalenona em cereais e rações (FAZEKAS & TAR, 2001).

Com a crescente exigência das legislações, permitindo níveis de contaminação de micotoxinas cada vez menores, principalmente pelos países importadores, busca-se desenvolver métodos analíticos mais sensíveis, específicos e validados. A produção de imunorreagentes para desenvolvimento de metodologias acessíveis aos laboratórios de controle de qualidade de todo o país deve ser incentivada. Assim, propôs-se validar intralaboratorialmente CIA baseada em suporte ativado Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal (AcM) IgG anti-OTA.1 imobilizado, para determinação de OTA em vinho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE ACM IGG ANTI-OTA

O AcM IgG anti- OTA foi produzido empregando hibridoma linhagem OTA.1 secretor de AcM (isotipo IgG₁ kappa) específico para OTA, derivado de mieloma linhagem Sp2/0-Ag14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, produzido por Kawamura *et al.*, 1989, na *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo, Japan*. Apresentou reatividade cruzada com OTC de 63,1 %, com OTB de 0,63%, com OT α de 0,06 % e para 4-hidroxi-OTA 1,19 %. O cultivo do hibridoma foi iniciado em meio RPMI com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (37° C, 5 % CO₂), seguido de adaptação gradual por adição de 10, 20, 30, 50, 75 e 100 % de meio H-SFM (*Hybridoma- Serum Free Medium*), suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 2 mM de glutamina (Gibco Co., USA). Os sobrenadantes dos cultivos foram colhidos após 4 a 5 dias de incubação sem reposição de meio e foram centrifugados (2400 x g, 10 min a 4° C). Na confecção das CIAs

utilizadas neste trabalho, CIA 5 (5mg de IgG /mL de Affi-Gel) e CIA 10 (10mg de IgG/mL de Affi-Gel) foram utilizados os AcM IgG anti-OTA obtidos dos sobrenadantes de cultivo com 75 e 100% H-SFM os quais foram adicionados de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ até concentração final de 60% de saturação e agitados por 16 horas a 4° C para purificação de IgG e após, centrifugados (8000x g, 30 min a 4° C). Os precipitados contendo IgG foram suspensos em pequeno volume de tampão PBS (10 mM, pH 7,3) (aproximadamente 10% do volume original) e dialisados contra mesmo tampão (4 x 1 L) a 4° C por 16 horas, seguida de água ultra-pura (Purelab Elga, Lane End, England) por mais 16 horas a 4° C (HARLOW & LANE, 1988c;. VANKOVÁ *et al.*, 1998). Após diálise, a concentração de IgG foi determinada pelo método de Bradford (1976); o grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme método de Laemmli (1970) e a atividade anti-OTA por i-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1989).

2.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE OTA PELAS CIAS 5 E 10 BASEADAS EM SUPORTE AFFI-GEL

A capacidade de retenção de OTA pelas CIAs 5 e 10 foi avaliada para seis concentrações de OTA: 0,5; 1; 2; 5; 10 e 15 ng), sendo aplicados em cada CIA 10 mL de OTA (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5 e 2 ng/mL) em PBS-bicarbonato de sódio a 1 % (1:1), sob fluxo de 1-2 gotas/seg. As CIAs foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl + Na₂CO₃ e em seguida com 5 mL de água ultra-pura (1-2 gotas/seg). A OTA ligada à CIA foi eluída com 3 mL de metanol e quantificada por CLAE.

2.3 VALIDAÇÃO INTRA-LABORATORIAL DE CIA AFFI-GEL (CIA 5)

Para estudo de validação a CIA 5 foi avaliada quanto à possibilidade de reuso, e quanto à eficiência na limpeza e recuperação de OTA de matrizes de vinho tinto (VT) artificialmente contaminadas (0,5; 2 e 5 ng de OTA/mL) e de vinho tinto e branco naturalmente contaminadas, mediante comparação com uma CIA comercial. Não foi realizada validação em matriz de vinho branco (VB), visto esta ser menos complexa em relação à matriz de VT.

2.4 AMOSTRAS

As amostras utilizadas nos experimentos foram adquiridas no comércio local e em vinícolas. Para o estudo de recuperação de OTA de amostras artificialmente contaminadas foram utilizadas amostras de VT (pool das variedades: Izabel, Bordô, Cabernet Sauvignon e Merlot) negativas para OTA ($< 0,042\text{ng/mL}$ por CLAE), as quais foram contaminadas com OTA diluída em acetonitrila: água (1:1) obtendo-se matéria prima contendo 0,5; 2 e 5 ng/mL. Após repouso a 25° C por 24 horas, as amostras foram extraídas e submetidas à limpeza em CIA 5 e CIA comercial e analisadas por CLAE.

2.5 LIMPEZA EXTRAÇÃO DE OTA DE MATRIZ VINHO EM CIA

A extração e limpeza das amostras artificialmente e naturalmente contaminadas foi realizada com 10 mL de vinho adicionados de 10 mL da solução 1% Polietilenoglicol + 5% NaHCO_3 , pH 8,3. A mistura foi agitada e filtrada em filtro de vidro e após, dividida em duas alíquotas de 10 mL que foram aplicadas lentamente através da CIA 5 e CIA comercial ao mesmo tempo. As CIAs foram lavadas com 5 mL da solução 2,5% NaCl + 0,5% NaHCO_3 e após com 5 mL de água. OTA foi eluída de CIA comercial com 2 mL de metanol e de CIA 5 com 3 mL, sendo o eluato seco sob N_2 .

2.6 DETERMINAÇÃO DE OTA POR CLAE

A análise de OTA foi realizada conforme o descrito no manual da Vicam (2005) com algumas modificações. O resíduo seco foi dissolvido em fase móvel (acetonitrila-água-ácido acético, 99:99:2, v/v/v, pH 3,2) 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 C_{18} (5 μm , 4 x 250 mm, Merck, Germany). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 e 475 nm, respectivamente e o fluxo da fase móvel de 0,8 mL/min. O limite de detecção para OTA foi calculado como sendo três vezes o DP e o limite de quantificação como sendo 10 vezes (DP foi obtido de sete medidas de cada matriz contaminada artificialmente com 0,1 ng de OTA/mL) (Soares, 2006). A concentração das amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de calibração com concentrações de 5 a 100 ng de OTA/ mL de acetonitrila-água (1:1).

2.7 REGENERAÇÃO DE CIA E EFICIÊNCIA PÓS-USO

As CIAs foram avaliadas quanto à possibilidade de regeneração segundo Nakajima *et al.* (1990). Após cada uso as colunas foram lavadas com 5 mL de tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 8,5 + NaCl 0,5 M, seguido de 5 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5 + NaCl 0,5 M e 5 mL de PBS. Após lavagem, as colunas foram mantidas em PBS + 0,02% de azida sódica (NaN_3) a 4° C por 72 horas e reutilizadas sucessivamente por até 5 vezes. A eficiência do processo de regeneração foi determinada calculando-se a razão entre a concentração de OTA recuperada após cada uso de CIA (ng/mL) e a capacidade original da coluna referente ao primeiro uso expressa como porcentagem.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados referentes à padronização e validação de CIA Affi-Gel foram resumidos por meio de média e desvio padrão apresentados na forma de tabelas. A comparação das porcentagens de recuperação de OTA adicionada em CIA 5 e 10, bem como a comparação entre CIA comercial e CIA 5 na taxa de recuperação de OTA de vinho tinto artificialmente contaminado e de vinhos tinto e branco naturalmente contaminados foram feitas pelo teste ANOVA e o *post hoc test* utilizado foi o de Tukey, sendo que diferenças significativas foram estabelecidas para $p \leq 0,05$ através da utilização do software SPSS versão 15.0. A correlação entre CIA comercial e CIA 5 na determinação de OTA de vinhos tinto e branco naturalmente contaminados foi feita pelo teste de correlação de Pearson e pela regressão linear.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

CIAs para micotoxinas são baseadas na interação entre Ac e micotoxina, sendo que anticorpo policlonal (AcP) ou AcM anti-micotoxina é imobilizado em um gel e na passagem do extrato pela CIA, a micotoxina se liga ao Ac específico. A utilização de AcM é mais vantajosa, pois apresenta especificidade e afinidade uniforme, aliado à baixa reatividade cruzada, conferindo eficiente limpeza de amostra, mesmo para matrizes complexas (PFEIFFER *et al.*, 1987; SCOTT & TRUCKSESS, 1997).

A especificidade do Ac é importante, principalmente em relação à extensão do reconhecimento da micotoxina em comparação com co-extrativos estruturalmente similares que podem estar presentes na matriz alimentar, enquanto a avidéz irá influenciar a taxa de recuperação durante a eluição. Também deve ser levada em consideração a capacidade da coluna em termos de número total de sítios de Ac disponíveis, pois uma sobrecarga da coluna conduzirá a recuperação pobre. Após imobilização do Ac, em torno de 0,2-0,5 ml de gel é acondicionado em coluna com PBS e no momento de uso o extrato bruto da amostra é aplicado lentamente na CIA (SENYUVA & GILBERT, 2010).

O imunossuporte utilizado para imobilização do anticorpo deve apresentar alta capacidade de ligação e ao mesmo tempo evitar ligações inespecíficas. Neste estudo foi utilizado o imunossuporte ativado Affi-Gel 10, o qual promove ligação com a molécula de anticorpo via aminas primárias (BIO-RAD, 2000). Depois da adição do IgG, a porção N-hidroxisuccinimida é deslocada e uma ligação amida estável é formada. Como o éster reativo está imobilizado no gel e apresenta alta seletividade, para grupos amina primários, falsas reações com o ligante são eliminadas.

As CIAs utilizadas neste trabalho CIA 5 e CIA 10 foram desenvolvidas anteriormente baseadas em suporte ativado Affi-Gel 10 e AcM IgG anti-OTA (figura 1) imobilizado em concentrações de 5mg de AcM IgG/mL de Affi-Gel para CIA 5 e 10 mg para CIA 10 e capeadas com etanolamina-HCl 1,0 M (pH 8,0), sendo que após confecção foram acondicionados 0,5 mL de gel em coluna de polipropileno (Muromac Columns, Japão). A eficiência de imobilização de AcM IgG foi de 86,43% (4,3 mg) para CIA 5 e de 85,18 % (8,5 mg) para CIA 10. As CIAs foram avaliadas quanto à eficiência de retenção de OTA, sendo aplicados 20 ng de OTA, sendo que a CIA 5 reteve 72% (14,4 ng de OTA) e CIA 10, 77% (15,4 ng), resultando em atividade específica (ng de OTA retida/mg IgG imobilizado) de 6,54 para CIA 5 e 3,58 para CIA 10.

Neste trabalho CIA 5 e 10 foram inicialmente avaliadas quanto à eficiência na recuperação de OTA em tampão PBS-bicarbonato de sódio a 1 % (1:1) para seis concentrações: 0,5; 1; 2; 5; 10 e 15 ng visando posterior validação em matriz alimentar. Na tabela 1 estão elencados os resultados para as duas CIAs. Observou-se que para menores concentrações de OTA a taxa de retenção foi maior, diminuindo à medida que aumentou a concentração de OTA. Para OTA em concentração de 0,5 ng, alta taxa de retenção de 94% foi obtida tanto pela CIA 5, quanto pela CIA 10. Para concentração de OTA de 1 ng a retenção foi de 82% pela CIA 5 e de 87% pela CIA 10. Já para 10 ng de OTA, CIA 5 e CIA 10

mesma percentagem de retenção (73 %) foi obtida. Uma vez que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na taxa de retenção de OTA entre CIA 5 e 10 e que CIA 5 é confeccionada com metade da concentração utilizada para confecção de CIA 10, prosseguiu-se o estudo de validação intra-laboratorial com CIA 5.

Tabela 1 – Percentagem de retenção de OTA (em tampão PBS-bicarbonato de sódio 1%) adicionada em CIA Affi-Gel (CIA 5 e CIA 10)

CIA Affi-Gel (mg IgG/ mL Affi-Gel imobilizado)	OTA Adicionada ^a (ng/mL)	Total OTA Adicionada (ng)	OTA recuperada (ng)	% recuperação	CV (%)
CIA 5 (4,3mg/mL)	0,05	0,5	0,47±0,02	94,0±4,27 a ^b	4,54
	0,1	1,0	0,82±0,09	82,0±9,83 b	11,98
	0,2	2,0	1,60±0,08	80,1±4,40 c	5,49
	0,5	5,0	3,82±0,08	76,4±1,62 d	2,12
	1,0	10,0	7,30±0,21	73,0±2,12 e	2,90
	1,5	15,0	10,8±0,46	72,0±3,06 f	4,25
CIA 10 (8,5mg/mL)	0,05	0,5	0,47±0,03	94,0±5,16 a	5,49
	0,1	1,0	0,87±0,05	87,0±4,92 b	5,66
	0,2	2,0	1,68±0,12	84,0±6,13 c	7,29
	0,5	5,0	3,85±0,18	77,0±3,70 d	4,80
	1,0	10,0	7,30±0,06	73,0±0,63 e	0,86
	1,5	15,0	12,2±0,13	73,0±0,89 f	1,22

^a Foram adicionados à CIA 5 e CIA 10, 10 mL de solução de OTA em tampão PBS-bicarbonato de sódio 1 % (1:1) sob fluxo de 1-2 gotas/segundo.

^b Letras iguais na mesma coluna significa que não houve diferença significativa entre as CIAs pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^c Média ± DP de duas repetições em duplicata.

A validação intra-laboratorial de CIA 5 foi realizada em comparação com CIA comercial (figura 2), sendo iniciado com avaliação da recuperação de OTA de matriz de VT (negativa para OTA, $< 0,042$ ng/ mL por CLAE) artificialmente contaminada com 0,5; 2 e 5 ng/mL. Para esta avaliação utilizou-se um pool de VT constituído com as variedades Izabel, Bordô, Cabernet Sauvignon e Merlot. Segundo Senyuva & Gilbert, 2010, o desempenho de uma coluna comercial ou fabricada no próprio laboratório (*in house*) pode ser avaliado com base na recuperação do analito que pode ser obtida com adição de padrões.



Figura 1 – Coluna de imunoafinidade baseada em suporte ativado Affi-Gel-10 empregando AcM IgG anti-OTA.1



Figura 2 – CIA comercial

Observou-se (tabela 2) que para a concentração de OTA de 0,5 ng/mL a CIA 5 propiciou recuperação de 80,5 % (0,4 ng/mL), enquanto a CIA comercial recuperou 76,85 % (0,38 ng/mL). Para o nível de contaminação de 2 ng/mL, máximo permitido Comunidade Européia a CIA comercial mostrou-se superior com taxa de recuperação de 86,14 % (1,72 ng/mL) contra 76,87% da CIA 5. Para a maior concentração de OTA avaliada de 5 ng/mL, a CIA comercial recuperou 84,97 % (4,24 ng/mL), enquanto a CIA Affi-Gel recuperou 76,75% (3,84 ng/mL). Não foi encontrada diferença significativa entre CIA comercial e CIA 5 na taxa de recuperação de OTA para as concentrações de 0,5 e 5 ng/mL, mas diferença foi observada para 2 ng de OTA/mL ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Comparação entre CIA comercial e CIA 5 na recuperação de OTA de vinho tinto artificialmente contaminado.

OTA adicionada (ng/mL)	CIA comercial ^a			CIA 5 ^a			Razão CIA 5/ CIA comercial
	OTA recuperada (ng/mL)	Recuperação (%)	CV (%)	OTA recuperada (ng/mL)	Recuperação (%)	CV (%)	
0,5	0,38	76,85±5,03 aA ^b	6,53	0,40	80,50±1,91 bA	2,39	1,04
2	1,72	86,14±6,53 aB	7,59	1,54	76,87±8,50 bC	11,04	0,89
5	4,24	84,97±3,10 aD	3,64	3,84	76,75±3,98 bD	5,94	0,90

^a Média ± DP de duas repetições em duplicata.

^b Letras minúsculas iguais na mesma coluna (análise entre as diferentes concentrações de OTA) e letras maiúsculas iguais na mesma linha (análise entre CIAs) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

Recuperação de micotoxina de CIA ocorre em função da especificidade dos Acs, das suas concentrações e da acessibilidade do Ag ao Ac quando o extrato da amostra é aplicado através da coluna, sendo dependente das características do gel e da velocidade de fluxo da passagem da amostra. Quando o fluxo é alto, pode impedir a ligação da micotoxina enquanto fluxo adequado garante boa recuperação. O desempenho da CIA pode ser afetado pela baixa concentração de Acs imobilizados ou Acs com baixa afinidade ou avidéz, ou ainda devido a protocolo de eluição não adequado, resultando em baixa recuperação. Estudos comparativos entre colunas comerciais e *in-house* mostram que mesmo as colunas comerciais podem apresentar falhas na etapa de ligação do analito ao Ac imobilizado (SENYUVA & GILBERT, 2010).

Dentro do processo de validação de CIA 5 foi avaliada sua aplicabilidade na limpeza de amostra e recuperação de OTA de vinhos naturalmente contaminados em comparação com a CIA comercial. No processo de extração das 14 amostras de vinho (10 VT e 4 de branco-VB), o extrato obtido de cada amostra foi dividido em dois volumes exatamente iguais e aplicados em cada CIA ao mesmo tempo, reduzindo assim, possíveis erros decorrentes do preparo e processo de extração. Para VT, CIA 5 apresentou recuperação superior para cinco amostras e para vinho branco para duas amostras (tabela 3). A razão CIA 5/ CIA comercial variou de 0,79 a 1,40 para VT e de 0,85 a 1,24 para VB. A análise de correlação realizada pelo teste de correlação de Pearson mostrou alta correlação ($R= 0,9539$) entre CIA 5 e CIA comercial (figura 3).

Tabela 3 – Estudo comparativo entre CIA comercial e CIA Affi-Gel (CIA 5) na determinação de OTA de vinhos tinto e branco naturalmente contaminados

Vinho	Amostra	OTA Recuperada (ng/mL)*				Razão CIA 5/ CIA Comercial
		CIA Comercial	Média	CIA 5	Média	
Tinto	1	0,14±0,20		0,12±0,03		0,86
	2	0,16±0,26		0,18±0,07		1,13
	3	0,24±0,06		0,21±0,06		0,79
	4	0,25±0,10		0,25±0,04		1,00
	5	0,27±0,03	0,34	0,29±0,04	0,35	1,07
	6	0,29±0,01		0,24±0,04		0,83
	7	0,30±0,02		0,32±0,07		1,07
	8	0,33±0,04		0,37±0,03		1,12
	9	0,41±0,20		0,57±0,02		1,40
	10	0,99±0,08		0,91±0,03		0,92
Branco	11	0,33±0,14		0,37±0,12		0,89
	12	0,39±0,12	0,58	0,38±0,01	0,62	0,97
	13	0,71±0,07		0,60±0,08		0,85
	14	0,90±0,02		1,12±0,03		1,24

* Média ± DP de duas repetições em duplicata.

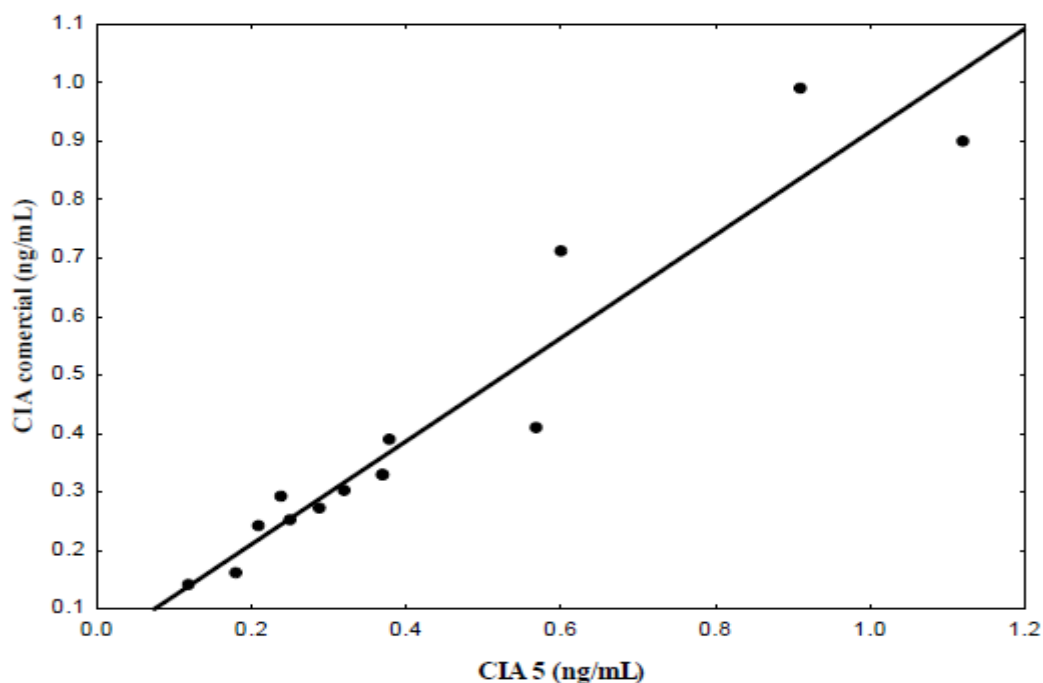


Figura 3 – Correlação entre CIA comercial e CIA Affi-Gel 10 na determinação de OTA de amostras de vinho tinto e vinho branco, naturalmente contaminadas. Os eixos x e y correspondem à concentração de OTA (ng/mL) determinadas independentemente pela utilização de CIA comercial e CIA 5 na etapa de limpeza e concentração de OTA para análise em CLAE. O coeficiente de correlação $R = 0,9539$ foi calculado pela equação de regressão linear $Y = 0,03431x + 0,88191$.

As desvantagens em relação ao alto custo de CIA comercial para aplicação na rotina de controle de qualidade e a alta quantidade de AcM IgG necessária para confecção de CIA *in house*, podem ser minimizadas com aplicação de eficiente processo de regeneração de coluna possibilitando seu reuso sem perda significativa na atividade. Com esse intuito foi avaliada também neste trabalho a possibilidade de reutilização da CIA 5 em comparação com CIA Comercial durante cinco usos para amostras de VT artificialmente contaminadas.

Após cada uso CIA comercial e CIA 5 foram regeneradas e os resultados de recuperação de OTA durante os sucessivos usos estão apresentados na tabela 4. A análise de eficiência das CIAs após cada uso foi realizada calculando-se a razão entre a concentração de OTA recuperada (ng/mL) e a capacidade original de cada coluna referente ao primeiro uso.

Para a concentração de OTA de 0,5 ng/mL a CIA comercial apresentou recuperação de 76,81% no primeiro uso; 73,15% no segundo e 68,10% no terceiro, enquanto CIA 5 recuperou 80,50%, 78,97% e 78,30% respectivamente no primeiro, segundo e terceiro usos. Tanto para CIA comercial como para a CIA 5 não foi encontrada diferença significativa entre os três primeiros usos, mas foi encontrada entre terceiro, quarto e quinto usos para as duas CIAs. Por outro lado, comparação entre as duas CIAs mostrou que não houve diferença entre elas na taxa de recuperação no primeiro e segundo usos, mas houve diferença entre terceiro, quarto e quinto usos ($p < 0,05$), sendo que CIA Comercial apresentou recuperação de 52% e 38,86% no quarto e quinto usos e CIA 5 recuperação de 68,10% e 60,15%. Para essa concentração de OTA avaliada (0,5 ng/mL) pode-se inferir que tanto CIA comercial como CIA 5 apresentaram recuperação aceitável por até três usos consecutivos, após duas regenerações.

Em relação à eficiência pós-uso, a CIA 5 manteve 85% de recuperação no quarto uso em relação à primeira utilização e 75% após quinto uso, enquanto CIA comercial manteve 67,53% e 50,65% após quarto e quinto usos respectivamente.

Para a concentração de 2 ng de OTA/mL de vinho CIA comercial recuperou 86,14% no primeiro uso, caindo para 64,62% no segundo e para 56,37% no terceiro uso, existindo diferença significativa entre as três medidas. Já CIA 5 apresentou 76,87% de recuperação no primeiro uso, 74,45% no segundo uso e 70,75% no terceiro uso, sendo que não ocorreu diferença significativa entre as três medidas ($p < 0,05$). Observa-se na tabela 4 que para o quarto e quinto uso CIA comercial recuperou 43,75% e 37,52% respectivamente, enquanto CIA 5 obteve resultados superiores, de 54,47% e 52,48% no quarto e quinto usos.

Tabela 4 – Recuperação de OTA de vinho tinto artificialmente contaminado por CIA Comercial e CIA 5 durante cinco usos sucessivos e eficiência das CIA após cada uso

OTA adicionada (ng/mL)	Uso ^b	CIA Comercial ^a				CIA 5 ^a				Razão CIA 5/ CIA Comercial ^e
		OTA recuperada (ng/mL)	Recuperação (%)	CV (%)	Eficiência pós-uso (%) ^c	OTA recuperada (ng/mL)	Recuperação (%)	CV (%)	Eficiência pós-uso (%) ^c	
0,5	1	0,38	76,85±5,03 aA ^d	6,53	100,0	0,40	80,50±1,91 aA ^d	2,39	100,0	1,05
	2	0,37	73,15±1,41 aB	1,94	94,80	0,39	78,97±4,24 aB	5,37	98,75	1,05
	3	0,34	68,10±2,83 aC	4,16	88,30	0,38	78,30±5,65 aD	7,25	97,50	1,12
	4	0,26	52,06±2,83 bE	5,43	67,53	0,34	68,10±2,83 bF	4,16	85,00	1,31
	5	0,20	38,86±1,41 cG	3,63	50,65	0,30	60,15±2,83 bH	4,71	75,00	1,50
2	1	1,72	86,14±6,53 aA	7,59	100,0	1,54	76,87±8,50 aB	11,04	100,0	0,89
	2	1,25	64,62±4,95 bC	7,67	75,00	1,49	74,45±0,70 aD	0,94	93,13	1,19
	3	1,13	56,37±1,77 cE	3,14	65,47	1,42	70,75±1,06 aF	1,49	88,50	1,26
	4	0,88	43,75±2,47 dG	5,65	50,93	1,10	54,47±0,71 bH	1,30	68,13	1,25
	5	0,75	37,52±0,71 eI	1,89	43,50	1,05	52,48±3,54 bJ	6,73	65,63	1,40
5	1	4,25	84,97±3,10 aA	3,64	100,0	3,84	76,75±3,98 aA	5,94	100,0	0,90
	2	3,83	77,15±1,41 aB	1,83	90,82	3,73	74,37±0,42 aB	0,57	96,74	0,98
	3	3,11	62,15±4,38 bC	7,06	73,06	3,42	68,55±0,42 aC	0,62	89,19	1,10
	4	2,38	47,50±1,84 cD	3,87	55,88	3,23	64,62±0,85 bE	1,31	84,11	1,36
	5	2,14	42,67±1,84 dF	4,31	50,24	3,18	63,57±1,41 bG	2,22	82,81	1,49

CV= Coeficiente de Variação; a Média ± DP de duas repetições em duplicata; b Reutilização de CIA após processo de regeneração; c Eficiência de CIA pós-uso (ng/g) em relação à capacidade original (uso 1); d Letras minúsculas iguais na mesma coluna (análise entre diferentes usos da CIA) e letras maiúsculas iguais na mesma linha (análise entre CIAs) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); e Razão CIA 5/CIA comercial para cada uso.

Foi avaliada também recuperação pelas CIAs para 5 ng de OTA/mL de vinho. CIA comercial atingiu 84,97% de recuperação no primeiro uso; 77,15% no segundo e 62,15% no terceiro uso, sendo que não ocorreu diferença significativa entre primeiro e segundo uso, enquanto CIA 5 atingiu 76,75% no primeiro uso, 74,37% no segundo e 68,55% no terceiro, não ocorrendo diferença significativa nos três ($p < 0,05$). No quarto e quinto uso CIA comercial recuperou 47,5% e 42,67% respectivamente, contra recuperação pela CIA 5 de 64,62% e 63,57% respectivamente.

Pode-se observar ainda que CIA5 apresentou maior estabilidade no decorrer dos cinco usos e conseqüentemente maior eficiência pós-regeneração comparada à CIA comercial, sendo que para concentração de OTA de 0,5 ng/mL, apresentou em relação ao primeiro uso, eficiência de 98,76 a 75% do segundo ao quinto uso. Já para 2 ng de OTA/mL de vinho, apresentou variação de 93,13 a 65,63% e CIA comercial de 75 à 43,5 % do segundo ao quinto uso e para concentração de OTA de 5 ng/mL a CIA 5 apresentou a maior eficiência, sendo variação de 96,74 a 82,81% do segundo ao quinto uso, enquanto CIA comercial apresentou variação de 90,82% à 50,24%.

A diminuição gradual na recuperação de OTA e conseqüentemente na eficiência das colunas após cada uso, provavelmente se deva à inativação de AcM IgG imobilizado causada pelo solvente de eluição (metanol), somado à perda gradual de moléculas de AcM IgG imobilizadas ao gel durante os sucessivos processos de regeneração e ainda pela possibilidade de ter ocorrido interferência na ligação de OTA-Ac por componentes da matriz de VT, principalmente pigmentos. Assim testes para detectar ligações não-específicas devem ser realizados sempre que uma nova matriz é analisada ou quando surgem problemas com interferentes, sendo uma maneira de detecção a comparação com CIA de outros fabricantes (SENYUVA & GILBERT, 2010).

A CIA 5 confeccionada com suporte ativado Affi-Gel foi capeada com etanolamina pós-imobilização de AcM IgG, prevenindo assim a ocorrência de ligações inespecíficas ao gel de componentes da matriz alimentar, bem como de OTA, pois ligação não seletiva de OTA ao gel, reduziria a eficiência da coluna baseada em separação por bioafinidade levando à subestimação da quantidade de OTA eluída.

Em trabalho realizado anteriormente em nosso laboratório por Fujji (2007) foi desenvolvida CIA baseada em suporte sílica-hidrazida para aplicação em estudo de recuperação de OTA de arroz, milho e café artificialmente contaminados. Obteve recuperação variando de 69,72 à 29,21% para arroz, de 72,80 a 49,73% para milho e de 59,42 à 11,66%

para café durante cinco usos, enquanto a CIA comercial utilizada para comparação, recuperou taxas em torno de 90% durante cinco usos para arroz e milho e menor recuperação de 67,02% a 11,62% para café durante cinco usos. A autora atribuiu a baixa percentagem de recuperação pela CIA sílica-hidrazida à ausência de capeamento da CIA. Recomendou uso único para as três matrizes: arroz, milho e café, dado à baixa recuperação obtida na segunda utilização após regeneração, enquanto a CIA comercial apresentou recuperação aceitável por 5 usos consecutivos para arroz e milho e uso único para café.

A maior estabilidade e eficiência apresentada pela CIA 5, baseada em suporte Affi-Gel está associada à alta qualidade do AcM IgG anti-OTA produzido através de cultivo de hibridoma OTA.1, bem como ao maior volume de gel (0,5 mL) acondicionado na coluna em comparação com a CIA comercial confeccionada com volume em torno de 0,3 mL.

CONCLUSÃO

A produção de reagentes imunológicos aplicada ao desenvolvimento de imunotécnicas em países agropecuários é fundamental a fim de se garantir a competitividade frente à globalização. A CIA Affi-Gel confeccionada com 5mg de AcM IgG/mL (CIA 5) comprovou sua aplicabilidade na análise de OTA em vinho por até três usos. Uma vez que se dispõe de AcM específico a partir de cultivo de hibridoma deve-se continuar investindo na tecnologia de produção de CIA baseada em suporte Affi-Gel a fim de atender a demanda nacional minimizando custo referente a sua aquisição.

CONCLUSÕES

- O AcM IgG anti-OTA produzido em meio 100% H-SFM apresentou alta especificidade atingindo título de 1:10.000 em ic-ELISA, constituindo-se em reagente promissor para emprego em bioferramentas sensíveis.
- O ic-ELISA desenvolvido, padronizado e validado intra-laboratorialmente em comparação com CLAE ($R=0,975$), proporcionou sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão adequados, permitindo aplicação em análise de OTA em vinho tinto, rosado e branco.
- CIA Affi-Gel 5 confeccionada com 5mg de AcM IgG/mL obtido de cultivo em 75 e 100% H-SFM (1:1) e capeada com etanolamina foi validada intra-laboratorialmente em comparação com CIA comercial, apresentando alta correlação ($R=0,954$) na análise de 14 amostras naturalmente contaminadas confirmando sua aplicabilidade no controle de qualidade de vinho.
- A regeneração de CIA 5 visando reuso foi avaliada em comparação com CIA comercial, apresentando possibilidade de três usos para as concentrações analisadas (0,5; 2 e 5 ng/mL), enquanto CIA comercial permitiu três usos para 0,5 ng de OTA/mL mas apenas um ou dois usos para 2 e 5 ng de OTA/mL.
- A tecnologia de produção de CIA nacional baseada em suporte Affi-Gel é viável desde que condições ideais de confecção sejam estabelecidas, com enfoque na produção de AcM de alta especificidade, visando atender a demanda exigida pelo controle de qualidade de vinho.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Current importance of Ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v.64, p.903-906, 2001.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) Brasil - **Resolução RE n° 899**, de 29/05/2003.
- ALCAIDE, F. J. E.; AGUILAR, S. A. Validation study of immunochemical elisa assay for ochratoxin a quantification in dessert wines from sun-dried grapes. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 23 (1), p. 53-60, 2008
- ANGELINI, E., BAZZO, I., SAVINO, M., BORGO, M. Ochratoxin A : Comparison of Extraction Methods from Grapes and Quantitative Determination by Different Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits. **Journal of Food Protection**, v. 71, n.12, p. 2488-2496, 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 16 ed. Washington, C.C., v.2, 1995.
- 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.
- ALMELA, L.; RABE, V.; SÁNCHEZ, B.; TORRELLA, F.; LÓPEZ-PÉREZ, J. P.; GABALDÓN, J. A.; GUARDIOLA, L. Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. **Food Microbiology**, v.24, p.319-327, 2007.
- ARIÑO, A.; HERRERA, M.; ESTOPAÑAN, G.; JUAN, T. High levels of ochratoxin A in licorice and derived products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 366-369, 2007.
- BACALONI, A.; CAVALIERE, C.; FABERI, A.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of ochratoxin A in wine and beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53(14), p. 5518-5525, 2005.
- BARNA-VETRÓ, I.; SOLTÍ, 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.
- BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Cromatografia de Imunoafinidade. In: Adalberto Pessoa Jr, Beatriz Vahan Kilikian. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1 ed. Barueri, SP: Editora Manole Ltda, v. 1, p. 248-260, 2005.
- BASCARÁN, V.; ROJAS, A. H. D.; CHOUCIÑO, P.; DELGADO, T. Analysis of ochratoxin A in milk after direct immunoaffinity column clean-up by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1167(1), p. 95-101, 2007.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, S2–S4, 2006.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, 109:715–722, 2003.

BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in Grapes and Wine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 639-643, 2002.

BAÚ, M.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; MINGUEZ, S.; CABAÑES, F. J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p.125-130, 2005.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILANDIER, P.; LEBRIHI, A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1038-1044, 2004.

BELLI, N.; MARÍN, S.; ARGILES, E.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Effect of chemical treatments on ochratoxigenic fungi and common mycobiota of grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 157–163, 2007.

BELLI, N.; RAMOS, A. J.; CORONAS, I.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 839–844, 2005.

BELLÍ, N.; PARDO, E.; MARÍN, S.; FARRÉ, G.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 541-546, 2004 (a).

BERG, B. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? **Food Control**, v. 14, n. 4, p. 219-224, 2003.

BIO-RAD LABORATORIES. Disponível em < http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9065.pdf > Acesso em abril 2010.

BLANC, M.; PITTET, A. ; BOX, R.M.; VIANI, R. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 673-675, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 100, de 21 de dezembro de 2009. D.O.U de 22/12/09. **Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) de Micotoxinas em Alimentos**, 2009.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior. Instituto Nacional da Propriedade Intelectual- MIDIC/INPI. **Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996 – Lei da propriedade industrial**, Brasília, 1996.

BRASIL. Decreto no 99.066, de 08 de março de 1990. Regulamenta a lei no 7.678, de 08 de Novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva, 1990.

BRERA, C.; SORIANO, J. M.; DEBEGNACH, F.; MIRAGLIA, M. Exposure assessment to ochratoxin A from the consumption of Italian and Hungarian wines. **Microchemical Journal**, v. 79, p. 109–113, 2005.

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.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ocratoxina a en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en Espana y en otros paises eropeos. **Alimentaria**, v. 299, p. 107–113, 1999.

CASTEGNARO, M.; CANADAS, D.; VRABCHEVA, T.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I. N.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxin A through biomarkers. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 519–529, 2006.

CASTELLARI, M.; VERSARI, A.; FABIANI, A.; PARPINELLO, G. P.; GALASSI, S. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3917-3921, 2001.

CASTELLARI, M.; FABBRI, 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.

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.

CHU, F. S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 47, p. 562-569, 1984.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. 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, p. 3-5, 2005.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. (2006). Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 70, p. 12-34, 2006.

COZZI, G.; PERRONE, G.; EPIFANI, F.; PASCALE, M.; VISCONTI, A. Epidemiology of ochratoxin A producing fungi in Apulian vineyards. Poster 1422r presented at **XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, May 21–25; Istanbul, 2007.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Journal Letters**, v. 127, p.19-28, 2002.

DALL'ASTA, C.; LINDNER, J.D.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; NEVIANI, E.; MARCHELLI, R. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. **Food Chemistry**, v. 106, p. 729–734, 2008.

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.

DELAGE, N., D'HARLINGUE, A., CECCALDI, B. C. & BOMPEIX, G. Comparative study of screening methodologies for ochratoxin A detection in winery by-products. **Food Control**, v. 14, p. 225-227, 2003.

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.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F.J. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 861–866, 2004.

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 março 2010.

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.

FERNANDES, A.; VENANCIO, A.; MOURA, F.; GARRIDO, J.; CERDEIRA, A. Fate of ochratoxin A during a vinification trial. **Aspects of Applied Biology**, v. 68, p.73–80, 2003.

FINK-GREMMELS J., JAHN A., BLOM M.J. Toxicity and Metabolism of Ochratoxin A. **Natural Toxins**, n. 3, p. 214-220, 1995.

FLAGS, D.; DOMIJAN, A. M.; IVIC', D.; CVJETKOVIC, B.; PERAICA, M. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. **Food Control**, v.20, Issue 6, June, p.590-592, 2009.

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**, mar., v.50, n.2, p.349-359, 2007.

FUJII, S.; RIBEIRO, R. M. R.; SCHOLZ, M. B. 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.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R. Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado. EMBRAPA UVA E VINHO, Sistema de Produção, ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica, Jul./2003

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.

GAUGLITZ, G.; BRECHT, A. Optical probes and transducers. **Biosensors and Bioelectronics**; v.10, p. 923-936, 1995.

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.

GHITAKOU, S.; KOUTRAS, K.; KANELLOU, E.; MARKAKI, P. Study of aflatoxin B₁ and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin. **Food Microbiology**, v.23, 612–621, 2006.

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.

GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. **International Journal of Food Microbiology**, 118 (1), p. 87–91, 2007.

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, 223 – 227, 2006.

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.

GORYACHEVA, I. Y.; SAEGER, S. D.; NESTERENKO, I. S.; EREMIN, S.A.; VAN-PETEGHEM, C. Rapid all-in-one three-step immunoassay for non-instrumental detection of ochratoxin A in high-coloured herbs and spices. **Talanta**, v. 72, 1230–1234, 2007.

GORYACHEVA, I. Y.; SAEGER, S. D.; LOBEAU, M.; EREMIN, S. A.; BARNA-VETRÓ, VAN PETEGHEM, C. Approach for ochratoxin A fast screening in spices using clean-up tandem immunoassay columns with confirmation by high performance liquid

chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS), **Analytica Chimica Acta**, v. 577, 38–45, 2006.

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, p.183-238, 1993.

HARADA, K. I.; MATSUURA, K.; SUZUKI, M.; OKA, H.; WATANABE, M. F.; OISHJI, 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.

HARLOW E., LANE D. Storing and purifying antibodies. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 283-318, 1988 (c).

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

HARLOW E., LANE D. Monoclonal antibodies. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 139-243, 1988 (a).

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 5, p. 709-716, 2001.

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

HERNÁNDEZ, M. J.; VALME GARCÍA-MORENO, M.; DURÁN, E.; GUILLÉN, D.; BARROSO, C. G. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, p. 117–121, 2006.

HOLTZAPLLE, C. K.; CARLIN, R.T.I.; ROSE, B. G.; KUBENA, L. F.; STANKER, L. H. Characterization of monoclonal antibodies, to aflatoxin and molecular modeling studies of related aflatoxins. **Molecular Immunology**, v. 33, n 11/12, p. 939-946, 1996.

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.

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**, v. 56: 489-521, 1993.

IBRAVIN, 2008, A viticultura no Brasil, extraído de <http://www.ibravin.org.br/brasiltivitivinicola.php> 12:23 - Domingo, 10 de Outubro de 2010.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos/ coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, 1º Ed digital, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores Agropecuários**. In www.ibge.gov.br, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION- ICH. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INMETRO-INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: julho/2007.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Fifty-sixth meeting, Geneva, 6-15 February, p.1-33, 2001.

JORGENSEN, K. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food-A review of EU occurrence data. **Food Additives and Contaminants Supplement 1**, p. 26–30, 2005.

JUAN, C.; MOLTO, J. C.; LINO, C. M.; MAÑES, J. Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. **Food Chemistry**, v. 107, p. 525–530, 2008.

JUAN, C.; LINO, C. M.; PENA, A.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J.; SILVEIRA, I. Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection. **Talanta**, v. 73, p. 246–250, 2007.

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.

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.

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.

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.

- KHOURY, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; AZOURI, H.; DELIA, M. L.; LEBRIHI, A. Fungal contamination and Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 2244-2250, 2008.
- 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.
- 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.
- KONRAD, I.; KÖSCHENTHALES, R. Inhibition of phenylalanine tRNA syntetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. **Febs Letters**, v. 83, n 2, p 341-347, 1977).
- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LA PINE, T. R; HILL, H. R. Monoclonal Antibodies. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 64-70, 2001.
- 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.
- LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; PITT, JI; KAZI, B. A.; EMMETT, R. W.; SCOTT, E. S. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n.S1, p. S10-S17, 2006 (a).
- LEONG S. L, HOCKING AD, VARELIS P, GIANNIKOPOULOS G, SCOTT E. S. Fate of ochratoxin A during vinification of Semillon and Shiraz grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6460–6464, 2006 (b).
- LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.10, p. 83-88, 2004.
- LIDDELL, J. E.; CRYER, A. Tissue culture techniques. In: Liddell J.E, Cryer A. **A Practical Guide to Monoclonal Antibodies**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 7-31, 1991.
- 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.
- 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.

MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, M. L.; FERNÁNDEZ-JURI, M. G.; BARBERIS, C.; DALCERO, A. M. Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 213–218, 2007.

MAGNOLI, C.; VIOLANTE, M.; COMBINA, M.; PALACIO, G.; DALCERO, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 179-184, 2003.

MARAGOS, C. Fluorescence Polarization Immunoassay of Mycotoxins: A Review. **Toxins**, v. 1, p. 196-207; 2009.

MATEO, R.; MEDINA, A.; MATEO, E. M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 79–83, 2007.

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.

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.

MEDINA, A.; JIMENEZ, M.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 7–13, 2005.

MELLO, L. M. R. Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial – Panorama 2009- BOLETIM TÉCNICO- EMBRAPA UVA e VINHO, 2009 (a).

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2009- BOLETIM TÉCNICO- EMBRAPA UVA e VINHO, 2009 (b).

MIYAMOTO, K.; HAMADA, A.; KAWAMURA, O. Determination of Aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF2 monoclonal antibody-HPLC method. **Technical Bulletin of faculty of Agriculture**, Kagawa University, v. 60, n. 113, p. 75-81, February, 2008.

MIRAGLIA, M.; BRERA, C. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. Reports on Tasks for Scientific Cooperation. Directorate General of Health and

Consumer Protection. Brussels: European Commission, 2002. Online. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en. Acesso em 4 jan. 2009.

MITCHEL, D.; PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal Applied Microbiology**, 97, p. 439–445, 2004.

- MOLINIÉ, A.; FAUCET, V.; CASTEGNARO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B₁: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. **Food Chemistry**, v. 92, p. 391-400, 2005.
- MONACI, L.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state of-the-art and analytical challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 378(1), p. 96–103, 2004.
- MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Updated knowledge of phenolic compounds in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45, p. 85-118, 2005.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- NGUNDI, M. M.; SHRIVER-LAKE, L. C.; MOORE, M. H.; LASSMAN, M. E.; LIGLER, F. S.; TAITT, C. R.; Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages. **Analytical Chemistry**, Jan 1;77(1):148-54, 2005.
- NGUYEN, M. T.; TOZLOVANU, M.; TRAN, T. L.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Occurrence of aflatoxin B₁, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. **Food Chemistry**, 105, 42–47, 2007.
- NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, 659, p. 208–215, 2010.
- NUNES, E. O. População de fungos filamentosos e sua relação com micotoxinas presentes na uva e no vinho de Santa Catarina. **Tese de Doutorado em Engenharia Química**-Universidade Federal de Santa Catarina, 2008
- OIV- ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN. Resolution VITI-OENO 1/2005. Code of sound vitivinicultural practices in order to minimise levels of ochratoxin A in vine-based products, 2005.

OLIVEIRA, A. Q.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E. 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.

OLIVERI, C.; TORTA, L.; CATARA, V. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.127, n.1-2, p.147-154, 2008.

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.

ONO, E. Y. S.; BERND, L. P.; FUJII, S.; RIBEIRO, R. M. R.; HASHIMOTO, E. H.; HIROOKA, E. Y. *Princípios Básicos para Análise de Micotoxinas*, Editora da Universidade Estadual de Londrina, Londrina- Pr, 2007.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. **Food Additives and Contaminants**, 17, p. 793-798, 2000.

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.

PESTKA, J. J.; ABOUZIED, M.N.; SUTIKNO, T. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 120-128, 1995.

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.

PETTERSSON, H.; ABERG, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. **Food Control**, v. 14, n. 4, p. 229-232, 2003.

PETTERSON, D. S.; ROBERTS, B. A. Mycotoxins in animal feedstuffs: sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone, and T-2 toxin. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. V. 62 (6), p. 1265-7, 1979.

PFEIFFER, N. E.; WYLIE, D. E.; SCHUSTER, S. M. Immunoaffinity chromatography utilizing monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 97, p. 1-9, 1987.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, p. 61-99, 2007.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I.N.; CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: a

review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 282–302, 2004.

PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; PALLARONI, L.; PIVA, G. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants* 18:647–654. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p. 647–654, 2001.

PITTET, A.; ROYER, D. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 µg/kg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, p. 243–247, 2002.

RATOLA, N.; MARTINS, L.; ALVES, A. Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 319–324, 2004.

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

RHEMREV-BOOM, M. M.; YATES, M.; RUDOLPH, M.; RAEDTS, M. Immunoaffinity 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.

RICHARD, E.; HEUTTE, N.; SAGE, L.; POTTIER, D.; BOUCHART, V.; LEBAILLY, P.; GARON, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2420–2425, 2007.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y. J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, 159, p. 18-46, 2006.

ROBERTS, B. A.; PATTERSON, D. S. Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs, using a novel membrane cleanup procedure. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 58(6), p. 1178-81. 1975.

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

ROSA, R. C. A.; PALACIOS, V.; COMBINA, M.; FRAGA, M. E.; REKSON, .D. O; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, p. 408-414, 2002.

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.

SAEGER, S. D; VAN PETEGHEM, C. J. Flow-through membrane-based enzyme immunoassay for rapid detection of ochratoxin A in wheat. **Food Protection**, v 62, p. 65–69, 1999.

SAEGER, S. D.; SIBANDA, L.; DESMET, A.; VAN PETEGHEM, C. A collaborative study to validate novel field immunoassay kits for rapid mycotoxin detection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 135–142, 2002.

SANGARE-TIGORI, B.; MOUKHA, S.; KOUADIO, H. J.; BETBEDER, A. M.; DANO, D. S.; CREPPY, E. E. Co-occurrence of aflatoxin B₁, fumonisin B₁, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. **Food Additives and Contaminants**, Oct;23(10), p. 1000-1007, 2006.

SAUVANT, C.; HOLZINGER, H.; GEKLE, M. The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**. V. 15, p. 125–134, 2005.

SAVA, V.; REUNOVA, O.; VELASQUEZ, A.; SANCHEZ-RAMOS, J. Can low level exposure to ochratoxin-A cause parkinsonism? **Journal of the Neurological Sciences**, v. 249, p. 68-75, 2006 (b)

SAVA, V.; REUNOVA, O.; VELASQUEZ, A.; HARBISON, R.; SANCHEZ-RAMOS, J. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin- A. **Neurotoxicology**, v. 27, p. 82–92, 2006. (a)

SCHNEIDER, E.; CURTUI, V.; SEIDLER, C.; DIETRICH, R.; USLEBER, E.; MARTLAUBER, E. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. **Toxicology Letters**, v.153, p. 113-121, 2004.

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.

SENYUVA, H. Z., GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. **Journal of Chromatography B**, 878, p. 115–132, 2010.

SERRA, R. Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. **Tese de doutoramento em Engenharia Química e Biológica**, Universidade do Minho, Portugal, 2005.

SERRA, R.; MENDOÇA, C.; ABRUNHOSA, L.; PIETRI, A.; VENÂNCIO, A. Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. **Analytica Chimica Acta**, 513, p. 41-47, 2004.

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.

SCHNEIDER, E.; CURTUI, V.; SEIDLER, C.; DIETRICH, R.; USLEBER, E.; MARTLAUBER, E. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. **Toxicology Letters**, v.153, p.113-121, 2004.

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.

SHEPHARD, G. S.; FABIANI, A.; STOCKENSTRÖM, S.; MSHICILELI, N.; SEWRAM, V. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 1102-1106, 2003.

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.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, P. A.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A.; LAMARDO, L. C. A.; and SABINO, M. Ochratoxin A in wines and grape juice commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 533-537, 2006.

SIBANDA, L.; DE SAEGER, S.; BARNA-VETRO, I.; VAN PETHEGHEM, C. J. Development of a Solid-Phase Cleanup and Portable Rapid Flow-Through Enzyme Immunoassay for the Detection of Ochratoxin A in Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6964–6967, 2002.

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, p.43-51, 2006.

SOARES, L. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 72 (1), p. 22-26, 1989.

SOYÖZ, M.; ÖZÇELİK, N.; KILINÇ, I.; ALTUNTAS, I. The effects of ochratoxina A on lipid peroxidation and antioxidant enzymes: a protective role of melatonin. **Cell Biology and Toxicology**, v. 20, p. 213-219, 2004

SOLEAS, G. J.; YAN, J.; GOLDBERG, D. M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49(6), p. 2733–2740, 2001.

SOLFRIZZO, M.; PANZARINI, G.; VISCONTI, A. Fate of ochratoxin A during vinification of naturally contaminated primitivo and negroamaro grapes. Paper presented at the XIIth International IUPAC **Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. May 21–25; Istanbul, Turkey, p. 1425, 2007.

SPANJER, M. C.; RENSEN, P. M.; SCHOLTEN, J. M. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. **Food Additives and Contaminants**, 25(4), p. 472-89, 2008.

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.

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.

SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389(5), p. 1505-23, 2007.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20(18), p. 2649-2659, 2006.

SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S. Chromatographic and allied methods of analysis for select mycotoxins. In: GILBERT, J. **Progress in Food Contaminant Analysis**. London: Backie Academic e Professional, p. 65-146, 1996.

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.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p. 59–66, 2007.

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.

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.

TONIETTO, J. Vinhos brasileiros de 4º geração: o Brasil na era das indicações geográficas. Bento Gonçalves: Embrapa – Uva e Vinho, **Comunicado Técnico**, n.45, jun. 2003.

TOSCANI, T.; MOSERITI, A.; DOSSENA, A.; DALL'ASTA, C.; SIMONCINI, N.; VIRGILI, R. Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC–FLD quantitative method. **Journal of Chromatography B**, v. 855, p. 242–248, 2007.

UVIBRA- União Brasileira de Vitivinicultura, extraído de http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos, obtido em 15 de outubro de 2010.

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.

- VALENTINI, F.; COMPAGNONE, D.; GIRAUDI, G.; PALLESCHI, G. Amperometric detection in TMB/HRP-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 487, p. 83–90, 2003.
- 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.
- VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112–1113, 1965.
- 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.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 1-7, 2000.
- VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Review: Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 72–81, 2006.
- 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.
- VICAM, L. P. *OchraTest™ and OchraTest™WB HPLC Instruction Manual*, november 1, 2005.
- VISCONTI, A.; PERRONE, G.; COZZI, G.; SOLFRIZZO, M. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. **Food Additives and Contaminants**, February; v. 25(2), p. 193–202, 2008.
- VISCONTI, A.; GIROLAMO, A. Fitness for purpose—ochratoxin A analytical developments. **Food Additives and Contaminants**, 22 Suppl, v. 1, p.37–44, 2005.
- 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.
- VISCONTI A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column cleanup and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 864, p. 89-101, 1999.
- WATANABE, E.; YOSHIMURA, Y.; YUASA, Y.; NAKAZAWA, H. Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits. **Analytica Chimica Acta**, v. 433, p. 199-206, 2001.
- 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.

WYATT, G. M. Immunoassays for food poisoning bacteria and bacterial toxins. Londres: Chapman & Hall. 1992.

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.

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).

XIAO, H.; CLARKE, J.; MARQUARDT, R. R.; 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).

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wines and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 655-668, 1996.

ZINEDINE, A.; JUAN, C.; IDRISSE, L.; MAÑES, J. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. **Microchemical Journal**, v. 87, p. 154–158, 2007.

ZINEDINE, A.; BRERA, C.; ELAKHDARI, S.; CATANO, C.; DEBEGNACH, F.; ANGELINI, S.; SANTIS, B.D.; 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.