



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANA HAYASHI

**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFB₁:
COLUNA DE IMUNOAFINIDADE E ESPECTROFLUORIMETRIA
PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS**

Londrina
2007

LUCIANA HAYASHI

**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFB₁:
COLUNA DE IMUNOAFINIDADE E ESPECTROFLUORIMETRIA
PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2007

LUCIANA HAYASHI

**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFB₁:
COLUNA DE IMUNOAFINIDADE E ESPECTROFLUORIMETRIA
PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Myrna Sabino

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina, 22 de junho de 2007.

Dedicatória

*A Deus, por estar sempre presente em minha vida, me proporcionando
saúde, força, ânimo e coragem para a realização deste trabalho;
Aos meus queridos pais, Nelson e Misako, por acreditarem em mim e
me incentivarem, com muito amor e carinho, a nunca desistir dos
meus sonhos, estando presentes em todos os momentos,
não fisicamente, mas em meu coração.
Aos meus irmãos, Daniela, Marcos e Rafael, por estarem sempre ao
meu lado, me confortando, ouvindo minhas reclamações
e me ajudando a alcançar meus objetivos.
Ao Rogerio, por todo amor, compreensão e apoio dedicados a mim
nesta longa caminhada, sendo fundamental em minha vida
e na concretização desta etapa.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela orientação, paciência, incentivo, valiosos ensinamentos, por me fazer acreditar que este trabalho seria possível, meus sinceros agradecimentos.

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

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

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

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com os projetos proc. n. 506334/2004-0 e n. 473711/03-6, e SETI-UFG-Fundo Paraná com o projeto CV. 33/04-Prot. n.88;

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

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

Aos membros titulares da banca examinadora, Dra. Myrna Sabino e Dra. Eiko N. Itano, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento da dissertação;

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

À Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, pela colaboração e empréstimo de material para cultivo de células;

À Doutora e amiga Simone Fujii, pelos preciosos ensinamentos, apoio, colaboração, prontidão em esclarecer dúvidas, ajuda em momentos imprescindíveis e, sobretudo, pela amizade verdadeira que construímos nestes anos de convivência;

Aos amigos Letícia Schiavo, Joice Sifuentes dos Santos, Cleiton Ramos e Tatiane de Oliveira, pelo auxílio prestado no cultivo de células, produção de anticorpos e demais experimentos, colaboração, alegria e amizade;

À amiga Aniê Ieda Francabandiera, por toda ajuda prestada, pelo companheirismo, colaboração, apoio, incentivo, esclarecimentos de dúvidas de experimentos, e principalmente pelo carinho e amizade de sempre;

Às amigas “Florzeras”, Michele Rosset, Luciane Yuri Yoshiara, Suellen Jensen, Maíke Taís Maziero, Renata Dinnies Santos, Roselane Langer, Tatiana dos Santos, pelo precioso apoio, colaboração, dicas, companheirismo e, sobretudo, amizade;

Aos amigos Elisabete Hashimoto, Cláudio Ueno, Adriana da Silva, Caroline Calliari, Ricardo Reche Ribeiro, pela colaboração, ajuda, apoio, dicas, alegria e amizade;

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

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

Aos pós-graduandos e funcionários do Depto. Ciências Patológicas, em especial ao Alexandre Sasaki, Juliana, Fernanda, Nilson e Mari, pela ajuda e colaboração;

Aos amigos e colegas, Luciana Bernd, Elaine Moreno, Alexandre Morey, Luiz Morioka, Rafael Dias, Ana Augusta Xavier, Luciana Lobato, Alexandre Azevedo, Norma Pimentel, Magali Maganhini, Mery Rendón, Denis Marchi, Miriam, Eduardo Toledo, pelo companheirismo e momentos de alegria, que suavizaram os dias árduos de trabalho;

Aos meus grandes e queridos amigos, Gisele Carvalho, Douglas Gallo, Roberta Uherara, Jhonatan Liberato, Andréa Sera, Fernanda Komatsu, Kelcilene Nakamura, Alberto Duran, Vera Tatakihara, Alessandra Okino, Camila Brito, Aluísio Kreling, Saulo Godoy, Jorge Sasaki, Thaís Matheus, Aline Matheus, Sílvia Schmith, Eduardo Neri, que tanto me deram força, apoio, carinho e amizade, dentro e fora da universidade, e que moram em meu coração;

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

Aos meus familiares, em especial à minha prima Renata Nishimura, minha tia Nobue Taniguti e ao meu futuro cunhado Renato Banja, pelo apoio e incentivo constante, carinho, amor e amizade;

Ao meu querido namorado Rogerio Hashimoto, pelo apoio, paciência, compreensão, força, carinho, amizade, amor e felicidade proporcionados a mim, servindo de estímulo para a concretização do mestrado;

À Daniela, Marcos e Rafael Hayashi, meus queridos irmãos, pelo apoio, carinho, compreensão, alegria e amizade dedicados a mim;

Aos meus amados e queridos Pais, Nelson Yukio e Misako Taniguti Hayashi, por todo incentivo, apoio, amor, dedicação e esforços realizados para minha formação profissional;

A Deus, sobretudo, por ter me concedido o direito à vida, e a oportunidade de conviver com pessoas maravilhosas, fazendo minha vida valer a pena.

*"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

HAYASHI, Luciana. **Anticorpo monoclonal anti-AFB₁**: coluna de imunoafinidade e espectrofluorimetria para controle de qualidade de alimentos. 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A freqüente ocorrência de aflatoxina em produtos agrícolas causa impacto negativo no agronegócio brasileiro. A aflatoxina tem sido classificada em grupo 1 por *International Association in Research on Cancer*. A produção de imunorreagentes aliada ao desenvolvimento de métodos imunquímicos possibilitariam o controle de qualidade acessível e de baixo custo, visando prevenção de contaminação e fornecimento de alimentos seguros ao consumidor. Considerando a necessidade em minimizar a dependência de importação de *kits* imunquímicos para análise avançada de resíduos tóxicos na rotina laboratorial, introduziu-se a tecnologia de produção de anticorpo monoclonal (AcM) empregando hibridoma linhagem AF4, secretor de IgG específico para aflatoxina B₁ (AFB₁). O cultivo celular em meio sintético resultou em 632,63 mg de IgG purificada (82,18 µg/mL), superando a expectativa da obtenção de AcM descrito na literatura (50,00 µg/mL), sendo este atingido devido ao uso de L-glutamina e cultivo até morte celular. O AcM anti-AFB₁ semi-purificado e liofilizado foi utilizado na confecção da coluna de imunoafinidade (CIA) empregando suporte gel ativado Affi-Gel 10. A CIA Affi-Gel 10 de 0,5 mL apresentou capacidade de retenção de 25,32 ng de AFB₁, sendo a toxina eluída com 15 mL de metanol. Para quantificação empregou-se a espectrofluorimetria, padronizando o comprimento de onda para 360nm de excitação e 420 nm de emissão, baseado na maior sensibilidade e estabilidade entre leituras consecutivas de AFB₁ pura. A CIA Affi-Gel 10 desenvolvida não foi totalmente eficaz na limpeza de milho artificialmente contaminado com AFB₁. O capeamento da coluna ainda deve prosseguir com ensaios de melhoria, para atingir a eficácia equivalente à da CIA comercial Aflatest-P (VICAM) (recuperação de AFB₁ de 72,40 a 79,77 %). Outrossim, considerando a especificidade comprovada de AcM anti-AFB₁ produzido por meio do teste de capacidade de retenção, deve-se prosseguir estudo inserindo novas condições de capeamento de coluna e ensaios de padronização. Quanto à reutilização de CIA comercial Aflatest-P, após regeneração de coluna, os resultados mostraram-se variáveis, com 34,15 a 82,88 % de recuperação de AFB₁. O fato indicou que as colunas comerciais podem inferir erro de análise se reutilizadas, contra-indicando o reuso. Em suma, a produção de AcM IgG anti-AFB₁ foi atingida com sucesso, sendo aconselhável proceder ultrafiltração na etapa de concentração e manutenção a 4° C para conservar a integridade e atividade biológica do anticorpo. Assim, a disponibilidade de AcM específico, limpeza de extrato alimentar em única etapa cromatográfica, uso reduzido de solventes tóxicos e possibilidade de reutilização, justificam o desenvolvimento de CIA, visando minimizar o custo referente à aquisição e aplicação no controle de qualidade.

Palavras-chave: Aflatoxina B₁. Anticorpo monoclonal. Coluna de imunoafinidade. Espectrofluorimetria.

HAYASHI, Luciana. **Monoclonal antibody against AFB₁**: immunoaffinity column and spectrofluorimetry in food quality control. 2007. 103f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The frequent occurrence of aflatoxin in foodstuffs causes a potential negative impact on Brazilian agribusiness. Aflatoxin has been classified in group 1 by International Association in Research on Cancer. The production of immunoreagents associated with immunochemical assay developments could allow accessible and low cost quality control aiming prevention of contamination and safe food supply to consumers. Considering the need in minimizing the dependence on immunochemical kits imports, which are essential to carry out advanced toxic residues analysis routinely in laboratories, the technology of monoclonal antibody (mAb) using hybridoma cell line AF4 that produces IgG against aflatoxin B₁ (AFB₁) was introduced. Cell culture in synthetic medium raised 632.63 mg of purified IgG (82.18 µg/mL), overcoming the expectation described in literature, i.e. 50.00 µg/mL of mAb, due to the use of L-glutamine and cell culture until death. Semi-purified and lyophilized mAb against AFB₁ was used to prepare the immunoaffinity column (IAC) using activated Affi-Gel 10 immunoaffinity support. IAC Affi-Gel 10 coupled with 0.5 mL of IgG-gel showed an AFB₁ retention capacity of 25.32 ng, with further toxin elution from IAC with 15 mL of methanol. Spectrofluorimetry was used to quantify the AFB₁, where the excitation and emission wavelengths were standardized to 360 and 420 nm, respectively, which were selected based on the best sensibility and stability through consecutive readings of pure AFB₁. The IAC Affi-Gel 10 developed was not totally efficient concerning the cleaning-up of artificially contaminated corn with AFB₁. The end-capping procedure must be continued to reach the effectiveness which is equivalent to the commercial IAC Aflatest-P (VICAM) (recovery of 72.40 to 79.77 %). Nevertheless, taking into account the specific activity of mAb against AFB₁, checked by the AFB₁ retention capacity test, the following study should insert new conditions concerning column end-capping and standardizing assays. The reusability of IAC Aflatest-P was evaluated after column regeneration, but the data were variable, reaching 34.15 to 82.88 % for AFB₁ recovery. Such data showed that the reuse of commercial IAC may lead to analysis error. In short, the production of mAb against AFB₁ was successfully reached. It is also recommended a further procedure using ultrafiltration at the concentration step and antibody maintenance at 4° C to keep its integrity and biological activity. Therefore, the availability of specific mAb, cleaning-up of food matrices extract in a single chromatographic step and also toxic solvents reduced usage and their possible reusability justify the IAC development bearing in mind the reduction in quality control costs.

Keywords: Aflatoxin B₁. Monoclonal antibody. Immunoaffinity column. Spectrofluorimetry.

LISTA DE SIGLAS

Ac	Anticorpo
Acs	Anticorpos
AcM	Anticorpo Monoclonal
AcMs	Anticorpos Monoclonais
AFs	Aflatoxinas
AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AFM₁	Aflatoxina M ₁
AFM₂	Aflatoxina M ₂
Ag-Ac	Antígeno-Anticorpo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CIA	Coluna de Imunoafinidade
CIAs	Colunas de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNBr	Brometo cianogênico
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
GC-MS	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa
HAT	Meio <i>Dulbecco's modified Eagle's</i> , contendo 100 µM de hipoxantina, 0,4 µM de aminopterina e 16 µM de timidina
HEPES	<i>(N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])</i>
HPAC	Cromatografia por Afinidade de Alta Resolução
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
H-SFM	Meio <i>Hybridoma-SFM (serum free medium)</i>
IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
IC-ELISA	<i>Indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay</i>
IgG	Imunoglobulina G
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa
MFC	Coluna multifuncional
MSPD	<i>Matrix solid-phase dispersion</i>
OVA	Ovoalbumina
PBS	Tampão fosfato de sódio
RPMI	Meio RPMI 1640
SFB	Soro fetal bovino
SFE	<i>Supercritical-fluid extraction</i>
SPE	<i>Solid-phase extraction</i>
UV	Radiação ultravioleta
WHO	Organização Mundial de Saúde
2D-CCD	Cromatografia em Camada Delgada de duas dimensões

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de aflatoxinas	21
Figura 2 – Estrutura de aflatoxina M ₁ (AFM ₁) e aflatoxina M ₂ (AFM ₂).....	22
Figura 3 – Mecanismo de ação de AFB ₁ : início do processo de mutagênese no DNA.....	22
Figura 4 – Estrutura de aflatoxina Q ₁ e P ₁	23
Figura 5 – Procedimento de limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade.....	31
Figura 6 – Produção de anticorpo monoclonal	33
Figura 7 – Estrutura de AFB ₁ -oxime	34
Figura 8 – Ligação de AFB ₁ -oxime à proteína	34
Figura 9 – Reação de acoplamento de suporte Affi-Gel com ligante contendo grupos amina livre	41
Figura 10 – Estrutura de aflatoxicol I	55
Figura 11 – Recepção, reativação, adaptação, manutenção e cultivo de hibridoma AF4, com produção de anticorpo monoclonal anti-AFB ₁	56
Figura 12 – Vista microscópica de células de hibridoma AF4 em meio <i>Hybridoma</i> -SFM...	57
Figura 13 – Viabilidade de hibridoma AF4 por microscopia utilizando corante vital Azul de Trypan.....	58
Figura 14 – Purificação parcial de anticorpo monoclonal anti-AFB ₁ por precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄	68
Figura 15 – Desenvolvimento de coluna de imunoafinidade utilizando anticorpo monoclonal anti-AFB ₁ e suporte Affi-Gel 10.....	69
Figura 16 – CIA 1 anti-AFB ₁ confeccionada com 3 mL de Affi-Gel 10.....	75
Figura 17 – CIA anti-AFB ₁ confeccionada com 0,5 mL de Affi-Gel 10.....	75
Figura 18 – Comportamento da fluorescência de AFB ₁ com a variação de comprimento de onda de excitação e emissão	76
Figura 19 – Variação da fluorescência de AFB ₁ em função do tempo, utilizando 360 e 420 nm	77
Figura 20 – CIA anti-AFB ₁ confeccionada com 0,5 mL de Affi-Gel 10.....	84
Figura 21 – CIA comercial Aflatest-P (VICAM)	84
Figura 22 – Teste preliminar de recuperação de AFB ₁ em milho, com extração em tempo prolongado (30 min) e limpeza de amostra em CIA Aflatest-P e CIA Affi- Gel 10	85

Figura 23 – Teste de recuperação de AFB ₁ em milho, com extração em tempo reduzido (1 min) e limpeza de amostra em CIA Aflatest-P e CIA Affi-Gel 10.....	86
Figura 24 – Variação da taxa de recuperação de AFB ₁ em função da intensidade de fluorescência.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reatividade cruzada de AcM produzido por hibridoma AF4 em IC-ELISA.....	54
Tabela 2 – Viabilidade celular de hibridoma AF4 em diferentes condições de cultivo celular e tempo de manutenção a –185°C.....	55
Tabela 3 – Proteína (IgG) produzida em cultivo de hibridoma AF4.....	70
Tabela 4 – Comparação entre os processos de purificação de anticorpo monoclonal dos sobrenadantes 5 e 6.....	71
Tabela 5 – Teste preliminar de capacidade de retenção de AFB ₁ pela CIA Affi-Gel 10.....	71
Tabela 6 – Determinação de proteína (IgG) acoplada à CIA Affi-Gel 10.....	72
Tabela 7 – Capacidade de retenção de AFB ₁ pela CIA Affi-Gel 10 considerando diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão na análise espectrofluorimétrica.....	73
Tabela 8 – Teste preliminar de recuperação de AFB ₁ em milho, com extração em tempo prolongado (30 min) e limpeza de amosyta em CIA Affi-Gel 10.....	73
Tabela 9 – Teste de recuperação de AFB ₁ em milho, com extração em tempo reduzido (1 min) e limpeza de amostra em CIA Affi-Gel 10.....	74
Tabela 10 – Teste de recuperação de AFB ₁ em milho com limpeza de amosyta em CIA Affi-Gel 10 capeada com glicina-etil-éster ou leite desnatado.....	74
Tabela 11 – Teste preliminar de recuperação de AFB ₁ em milho, com extração em tempo prolongado (30 min) e limpeza de amostra em CIA comercial Aflatest-P.....	87
Tabela 12 – Teste preliminar de recuperação de AFB ₁ em milho, com extração em tempo prolongado (30 min) e limpeza de amostra em CIA Affi-Gel 10.....	87
Tabela 13 – Teste de recuperação de AFB ₁ em milho, com extração em tempo reduzido (1min) e limpeza de amostra em CIA comercial Aflatest-P.....	87
Tabela 14 – Teste de recuperação de AFB ₁ em milho, reutilizado CIA comercial Aflatest-P para limpeza de amostra.....	88
Tabela 15 – Teste de recuperação de AFB ₁ em milho, com extração em tempo reduzido (1 min) e limpeza de amostra em CIA Affi-Gel 10.....	89
Tabela 16 – Teste de recuperação de AFB ₁ em milho, com limpeza de amostra em CIA Affi-Gel 10 capeada com glicina-etil-éster ou leite desnatado.....	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 AFLATOXINA	17
2.2 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA	23
2.3 COLUNA DE IMUNOAFINIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA	28
2.4 ANTICORPO PARA TÉCNICAS IMUNOQUÍMICAS.....	31
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 MATERIAL	36
4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL IgG ANTI-AFB ₁	37
4.2.1 Linhagem de célula de hibridoma	37
4.2.2 Recepção e cultivo de hibridoma.....	37
4.2.3 Contagem e análise de viabilidade celular	38
4.2.4 Manutenção e recuperação de hibridoma	38
4.2.5 Produção de AcM IgG a partir de cultivo de hibridoma em meio sintético.....	39
4.2.5.1 4.2.5.1 Determinação de proteína (IgG).....	40
4.2.6 Purificação parcial de anticorpo monoclonal IgG anti-AFB ₁	40
4.2.6.1 Precipitação de IgG com sulfato de amônio - (NH ₄) ₂ SO ₄	40
4.3 DESENVOLVIMENTO DA COLUNA DE IMUNOAFINIDADE (CIA) PARA DETECÇÃO DE AFB ₁ EMPREGANDO ACM ANTI-AFB ₁	41
4.3.1 Preparo da CIA Affi-Gel 10: acoplamento aquoso	41
4.3.2 Manutenção de CIA Affi-Gel 10	42
4.3.3 Avaliação da eficiência de acoplamento de AcM à CIA Affi-Gel 10	42
4.3.4 Determinação da capacidade de retenção de AFB ₁ em CIA Affi-Gel 10.....	42
4.4 TESTE DE RECUPERAÇÃO DE AFB ₁ EM CIA AFFI-GEL 10.....	43
4.4.1 Contaminação de milho com AFB ₁	43
4.4.2 Extração de AFB ₁ de milho contaminado	43

4.4.3 Limpeza de extrato bruto pela CIA	44
4.4.4 Determinação de AFB ₁ por espectrofluorimetria	44
4.4.5 Regeneração de CIA	44
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE ESPECTROFLUORIMETRIA E CCD PARA ANÁLISE DE AFB ₁	45
4.5.1 Contaminação de milho com AFB ₁	45
4.5.2 Extração de AFB ₁ de milho contaminado	45
4.5.3 Limpeza de extrato bruto pela CIA	45
4.5.4 Quantificação de AFB ₁ por espectrofluorimetria	45
4.5.5 Determinação de AFB ₁ por cromatografia em camada delgada (CCD).....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CAPÍTULO I	48
ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B ₁ PARA CONTROLE DE QUALIDADE EM ALIMENTO.....	49
CAPÍTULO II	59
ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B ₁ : <i>SCALE-UP</i> , PURIFICAÇÃO- PARCIAL E DESENVOLVIMENTO DA COLUNA DE IMUNOAFINIDADE ..	60
CAPÍTULO III	78
COLUNA DE IMUNOAFINIDADE PARA ESPECTROFLUORIMETRIA: DETECÇÃO DE AFB ₁ EM MILHO PELA CIA COMERCIAL VERSUS CIA AFFI-GEL 10- AcM ANTI-AFB ₁ DESENVOLVIDA	79
6 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

A agricultura do Brasil é uma das bases mais potentes de economia do país, que garante o fornecimento contínuo de insumos baseados em cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e derivados oriundos de processamento.

A contaminação fúngica e a produção de metabólitos tóxicos constituem fatores inevitáveis e de difícil controle, que repercutem na qualidade de matéria-prima e saúde do consumidor. Considerando que a contaminação seja condicionada a fatores ambientais e características inerentes do substrato, a conduta tomada tem sido o controle de fitopatógenos baseado em fungicidas químicos e técnicas alternativas, com ênfase ao emprego de microrganismos inócuos à saúde humana, aprofundando-se para inserção de genes de interesse (modificação genética de matéria-prima) e mecanismos naturais de defesa da planta (compostos biativos). O fato fundamenta-se na maior inocuidade dos determinantes intrínsecos de vegetais, perante agressividade ao ecossistema e à saúde humana.

A relevância de fungos toxigênicos na cadeia alimentar é direcionada a espécies que contaminam produtos agrícolas nas etapas de pós-colheita, a exemplo de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, produtores de aflatoxinas (AFs). As propriedades toxicológicas desta micotoxina resumem-se em efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e imunossupressivos, incluindo toxicidade aguda e crônica.

As técnicas convencionais para proceder à análise de micotoxina incluem cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), cromatografia por afinidade e imunoensaio. A CLAE constitui a técnica recomendada para determinação quantitativa de micotoxinas-ficotoxinas. Porém o alto custo de equipamento e manutenção, necessidade de técnica especializada e extrema limpeza de extrato, restringem a disseminação na rotina laboratorial. A exigência de extrato límpido para análise em CLAE estimulou o desenvolvimento de técnicas de limpeza, envolvendo colunas em fase sólida para remoção de interferentes. Atualmente, destaca-se a coluna de imunoafinidade preparada com anticorpos anti-micotoxinas, cuja introdução de metodologia biológica à química conferiu rapidez, especificidade e alta recuperação na etapa de limpeza.

Conseqüentemente, a cromatografia por imunoafinidade tem sido amplamente difundida na análise quantitativa de micotoxinas e associada à CLAE e ELISA,

permitindo a combinação entre eficiência e especificidade da metodologia biológica à sensibilidade e alta resolução da CLAE.

Por outro lado, em consequência às dificuldades inerentes aos métodos convencionais de análise, o ensaio imunológico, a exemplo de ELISA, apontou entre as técnicas alternativas atrativas e promissoras para detecção direta de micotoxinas em alimentos. A vantagem consiste em pouca ou nenhuma necessidade de limpeza de amostra, simplicidade, baixo custo após padronização e reprodutibilidade, oferecendo análise rápida de triagem, resultados quantitativos com alto grau de sensibilidade e possibilidade de automação. Entretanto, a análise por ELISA restringe-se a determinados alimentos, devido a interações inespecíficas entre anticorpo e interferentes alimentares, resultando em superestimação em caso de ELISA competitivo indireto para análise da AFB₁. A precisão na reatividade desta técnica depende de anticorpo específico, sendo a alta especificidade essencial para evitar resultados falso-positivos.

A produção de anticorpo monoclonal anti-micotoxina tem despertado interesse na análise de alimentos, com ênfase a anticorpo anti-AFB₁, estando a qualidade deste reagente imunológico relacionada ao desenvolvimento de imunoenaios sensíveis para a micotoxicologia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AFLATOXINA

Aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (STROKA *et al.*, 2000b; GARDEN & STRACHAN, 2001; STROKA & ANKLAM, 2002; BLESA *et al.*, 2003; AMMIDA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; VENTURA *et al.*, 2004; EDINBORO & KARNES, 2005; LIU *et al.*, 2006; SALEEMULLAH *et al.*, 2006) e *Aspergillus nomius* (CHIAVARO *et al.*, 2001), capazes de crescer em uma variedade de produtos agrícolas. Ocorrem amplamente em produtos vegetais, especialmente milho, trigo, farinha de trigo, cevada, nozes, amêndoa, pistache, arroz, feijão, coco, semente de algodão, pimenta-malagueta, gengibre, pimenta, pimentão-doce, frutas, incluindo respectivos derivados, a exemplo de frutas secas, cerveja, ração, assim como produtos de origem animal devido à ingestão de ração contaminada, citando-se ovo, produtos lácteos e cárneos (JAIMEZ *et al.*, 2000; STROKA *et al.*, 2000b; CHIAVARO *et al.*, 2001; YONG & COUSIN, 2001; PAPP *et al.*, 2002; BLESA *et al.*, 2003; VENTURA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006). *Aspergillus flavus* é o principal fungo causador de contaminação por aflatoxina no estágio de pré-colheita (LIU *et al.*, 2006).

O termo aflatoxina é derivado de *Aspergillus flavus*, cuja primeira sílaba ‘a’ vem do gênero *Aspergillus*, a segunda, ‘fla’, da espécie *flavus*, e o termo ‘toxina’ do adjetivo ‘tóxico’ (PAPP *et al.*, 2002; SALEEMULLAH *et al.*, 2006).

Dentre os 18 análogos identificados, os mais tóxicos têm sido aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂) (Figura 1), sendo naturalmente prevalentes e rotineiramente monitorados (OTTA *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; GARDEN & STRACHAN, 2001; PAPP *et al.*, 2002; AMMIDA *et al.*, 2004). AFB₁ é uma micotoxina de baixa massa molecular (312,3 Da) (PESAVENTO *et al.*, 1997). AFB₁ e AFB₂ são assim designadas por apresentarem fluorescência azul intensa sob luz ultravioleta, enquanto que AFG₁ e AFG₂ mostram fluorescência amarelo-esverdeada (SALEEMULLAH *et al.*, 2006). Sendo derivado químico de difuranocumarina (Figura 1) (PAPP *et al.*, 2002), os análogos da série G diferem quimicamente dos da série B pela presença de um anel 3-lactona ao invés de um anel ciclopentanona. Além disso, uma dupla ligação entre os carbonos 8 e 9 é encontrada na forma de vinil éter no anel furano terminal em AFB₁ e AFG₁, mas não em

AFB₂ e AFG₂. Contudo, esta pequena diferença estrutural é associada à mudança bastante significativa na atividade biológica, já que AFB₁ e AFG₁ são mais carcinogênicas e tóxicas que AFB₂ e AFG₂ (JAIMEZ *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001). Do ponto de vista químico, a estrutura altamente conjugada e rígida da aflatoxina é responsável pela fluorescência natural. Pequenas variações estruturais que distinguem as aflatoxinas influem drasticamente na propriedade fluorescente, i.e. derivados G₂ e B₂ são muito mais fluorescentes que seus homólogos insaturados B₁ e G₁ (JAIMEZ *et al.*, 2000).

A aflatoxina exibe toxicidade aguda e crônica, incluindo efeito carcinogênico, mutagênico, teratogênico e imunossupressivo (JAIMEZ *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; PAPP *et al.*, 2002; BLESÁ *et al.*, 2003; AMMIDA *et al.*, 2004; EDINBORO & KARNES, 2005), sendo o fígado o principal órgão alvo (VENTURA *et al.*, 2004). AFB₁, reconhecidamente mais tóxica, tem sido detectada como análogo predominante em alimento (OTTA, *et al.*, 2000; PAPP *et al.*, 2002). A aflatoxina M₁ (AFM₁) (Figura 2), também conhecida como ‘toxina do leite’, constitui principal derivado metabólico de aflatoxina em inúmeras espécies de animais, sendo produzida por hidroxilação de AFB₁ pelo citocromo P450 do sistema microsomal hepático. AFM₁ é muito menos carcinogênica e mutagênica que AFB₁, mas possui toxicidade aguda similar ao das demais aflatoxinas. Geralmente pode ser encontrada em leite e produtos lácteos, como leite em pó, soro, manteiga, queijo, iogurte e sorvete, juntamente com aflatoxina M₂ (AFM₂), que é o análogo metabólico derivado de AFB₂ (CHIAVARO *et al.*, 2001).

A determinação de aflatoxina é dificultada pela presença em baixa concentração em matrizes alimentares complexas, apesar de ser, provavelmente, a micotoxina mais comum perante consumo humano (VENTURA *et al.*, 2004).

A ingestão prolongada dessas toxinas em baixa concentração também pode ser altamente perigosa. Estes compostos podem entrar na cadeia alimentar principalmente pela ingestão, mas também por inalação sob circunstâncias particulares, i.e. em locais de trabalho onde produtos contaminados são manuseados. Estudos focando a detecção de micotoxinas em fluídos biológicos tem esclarecido o mecanismo prejudicial à saúde. Após ingestão, AFB₁ é biotransformada para gerar um metabólito reativo 8,9-epóxido de AFB₁ ou AFB₁-epóxido (anteriormente denominado AFB₁-2,3 epóxido) originado por meio de epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB₁, capaz de ligar ao DNA assim como à soroalbumina, formando aflatoxina-N⁷-guanina e aflatoxina-N⁷-lisina respectivamente (Figura 3). A ligação covalente ao DNA é considerada etapa crítica na hepatocarcinogênese da aflatoxina, sendo a detecção destes

metabólitos atingida pelo desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) (PAPP *et al.*, 2002).

Apesar de alguns autores sugerirem que a hepatocarcinogênese em humanos não está diretamente associada à aflatoxina, a alta incidência de câncer hepático na África do Sul, Sudeste Asiático, Coréia, Taiwan e China pode estar ligada à combinação de alta exposição à aflatoxina na dieta com infecção pelo vírus da hepatite B (LEE *et al.*, 2004).

Devido à biotransformação, o consumo de rações contaminadas é responsável pela contaminação indireta por meio de alimentos de origem animal como carne, leite e outros produtos lácteos. AFM₁ acumula-se no leite bovino em animal que ingeriu AFB₁ (JAIMEZ *et al.*, 2000), sendo relativamente estável à pasteurização e estocagem, bem como subsequente processamento (BADEA *et al.*, 2004).

A biossíntese de aflatoxina é induzida por açúcares, associada com a ativação transcricional dos genes responsáveis e do gene regulador, *aflR*. A regulação da biossíntese de aflatoxina tem sido analisada manipulando este gene. Uma super expressão constitutiva do caminho transcricional do gene regulador *aflR* permitiu maior acúmulo de transcrição de genes e aumentou a produção de aflatoxina (PAPP *et al.*, 2002).

A ampla ocorrência de *Aspergillus* spp. e o alto conteúdo de carboidrato indicam vulnerabilidade de produtos agrícolas à contaminação fúngica, não implicando, porém, na presença de toxinas. As espécies fúngicas podem produzir aflatoxina sob condições de estresse, que incluem alta temperatura durante o dia (25 a 30° C), baixa temperatura durante a noite (10° C), alta umidade de armazenamento (70 a 90 %) e deficiência de nutrientes no solo (JAIMEZ *et al.*, 2000; PAPP *et al.*, 2002; TARÍN *et al.*, 2004, ABBAS, *et al.*, 2006).

A aflatoxicose causada pela ingestão de aflatoxina provoca dano hepático agudo, cirrose hepática, indução de tumores, prejuízo no sistema nervoso central, distúrbios de pele e defeitos hormonais, assim como a síndrome da má absorção e baixa resistência óssea. A toxidez em animal pode ser determinada pela taxa de formação de intermediários reativos, ligação com macromoléculas (DNA, RNA), grau de detoxificação e outras reações competitivas (SALEEMULLAH *et al.*, 2006).

Apesar da suscetibilidade humana à aflatoxina não ser totalmente elucidada, estudos epidemiológicos em regiões da África e Ásia com alta incidência de hepatoma revelaram uma associação entre incidência de câncer e aflatoxina na dieta. Severa hepatite humana devido à aflatoxicose foi registrada na Índia em 1974, com morte de 108 de 397 pacientes que consumiram milho contaminado com 250 a 15000 ng/g de aflatoxina. A doença

conhecida como ‘Cirrose da Infância Indiana’ tem sido em parte devido ao envenenamento por aflatoxina, assim como a ‘Síndrome de Reye’, com encefalopatia e degeneração gordurosa de víscera em criança. Na região endêmica da Tailândia, a AFB₁, AFG₁ e AFB₂ têm sido detectadas em fígado humano, sendo a presença de metabólito P₁ e Q₁ (Figura 4) relacionada ao câncer (JAIMEZ *et al.*, 2000).

Salienta-se o maior e mais severo surto de aflatoxicose aguda documentada em todo o mundo ocorrida na área rural do Kenia em abril de 2004; o surto envolveu 317 casos e 125 mortes, decorrente da ingestão de milho contaminado (LEWIS *et al.*, 2005).

International Agency for Research on Cancer (IARC) classifica AFB₁ no Grupo 1, i.e. como carcinógeno humano, e aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ no Grupo 2B, i.e. prováveis carcinógenos a humano. Por ordem de toxicidade, AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂ (IARC, 1993).

Limites legais a nível mundial dependem de considerações econômicas e variam de um país para outro, mas aproximadamente 119 países têm estabelecido limites legais para aflatoxina em alimentos e rações animais (FAO, 2004). Valores variam amplamente e tendem a ser mais altos em países subtropicais produtores de insumos agrícolas e mais baixos em nações consumidoras com clima temperado (CHIAVARO *et al.*, 2001).

A Comissão Européia estabelece o nível máximo aceitável de aflatoxina em cereais, amendoim e frutas secas para consumo humano em 4 ng/g para aflatoxina total (expresso pela soma das concentrações de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), 2 ng/g para AFB₁, e 0,05 ng/g para AFM₁ em leite. Novos limites estão sendo estabelecidos para AFB₁ em alimento para bebês (provavelmente 0,1 ng/g) e alimento de origem animal (em discussão 1 ng/g) (GARDEN & STRACHAN, 2001; STROKA & ANKLAM, 2002; AMMIDA *et al.*, 2004). Os limites para alimentos processados encontram-se em 15 ng/g para aflatoxinas totais e 8 ng/g para AFB₁ (GARDEN & STRACHAN, 2001).

O Comitê Científico Europeu para Alimento (*European Scientific Committee for Food*) tem advertido que o nível de micotoxina em alimentos deve ser reduzido ao nível mais baixo tecnicamente detectável. Com esse objetivo, uma nova Comissão de Regulação No. 466/2001 impôs, em 8 de março de 2001, limite de 2 ng/g de AFB₁ e 4 ng/g aflatoxina total em nozes, frutas secas e cereais para consumo humano direto (CHAN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; KOLOSOVA *et al.*, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) prescreve o limite de AFB₁ para vários produtos alimentícios em 5 ng/g e o nível de aflatoxina total não pode exceder 10 ng/g (PAPP *et al.*, 2002).

No Brasil, o limite máximo de aflatoxina total permitido pelas legislações específicas é de 20 ng/g em milho, amendoim e derivados para consumo humano, enquanto que para AFM₁ em leite fluido e leite em pó o limite máximo é de 5 ng/g. (ANVISA, 2002b). Esta legislação brasileira foi definida em consenso com MERCOSUL, com limite máximo de aflatoxinas permitido em 20 ng/g (ANVISA, 2002a).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA do Brasil, adota o limite de 50 ng/g de aflatoxina total para alimento destinado ao consumo animal (ingestão direta ou matéria crua de rações) (MAPA, 2002).

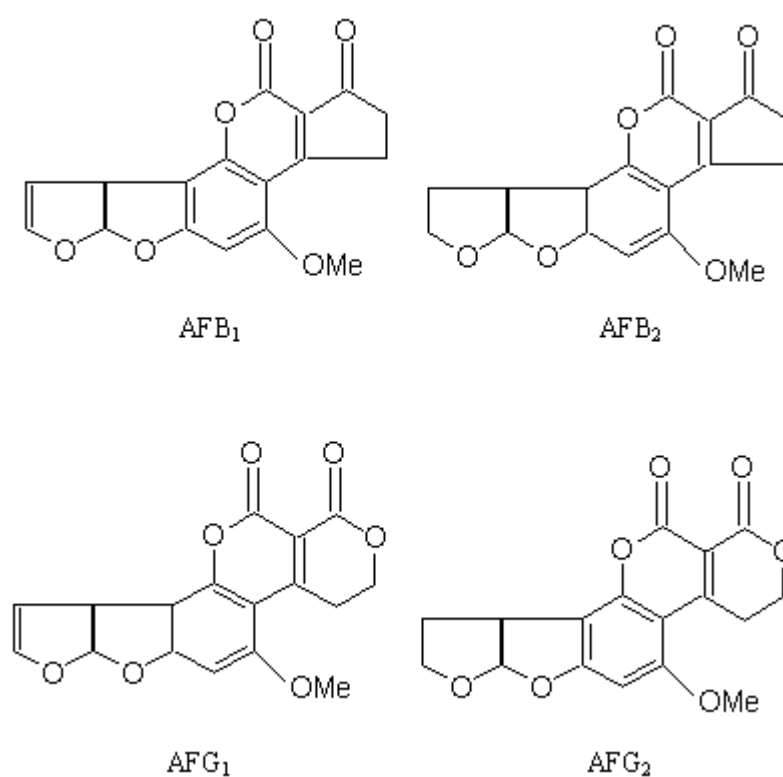


Figura 1 – Estrutura de aflatoxinas: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂).

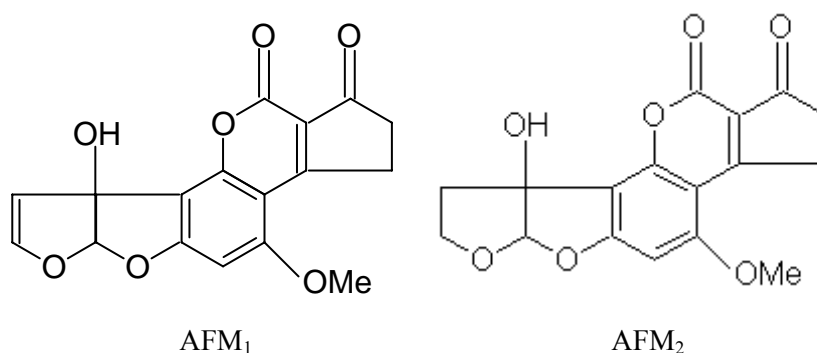
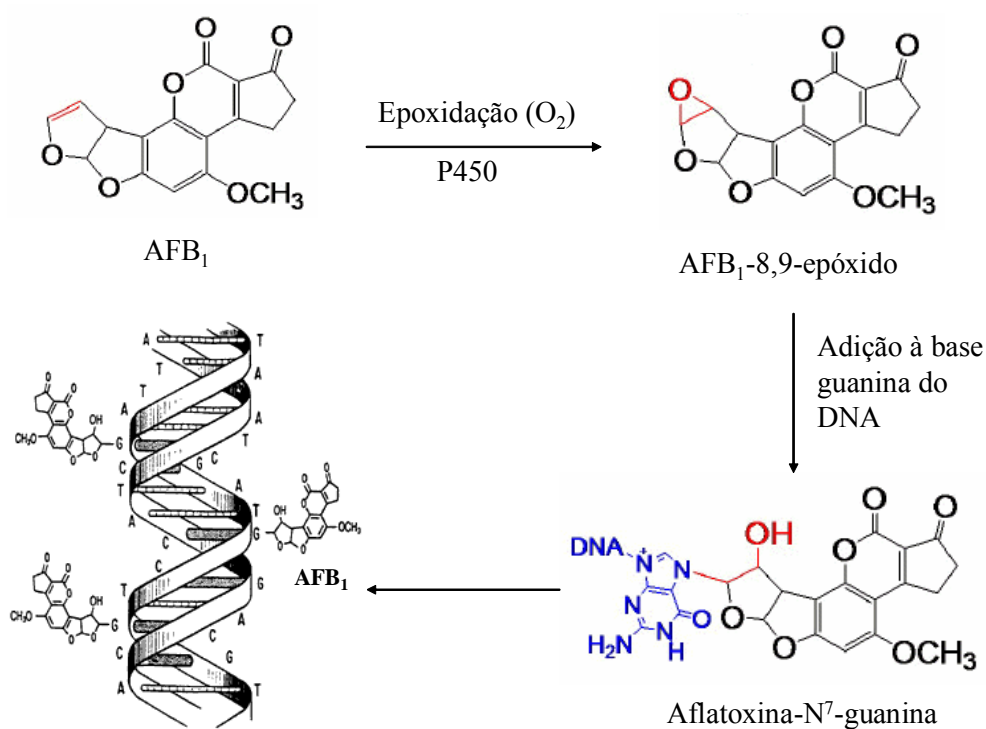


Figura 2 – Estrutura de aflatoxina M₁ (AFM₁) e aflatoxina M₂ (AFM₂).



(Fonte: IVISO; MYKOTOXINE)

Figura 3 – Mecanismo de ação de AFB₁: início do processo de mutagênese no DNA.

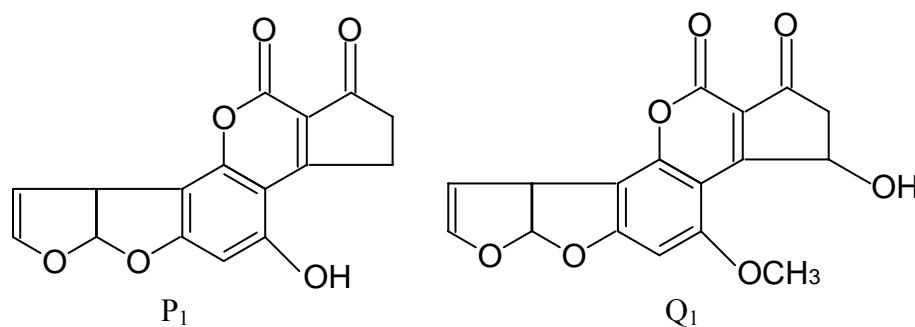


Figura 4 – Estrutura de aflatoxina Q_1 e P_1 .

2.2 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA

A presença inevitável de fungo, associada ao difícil controle de toxinas naturais pertencentes à categoria de micotoxina, gera dificuldades a órgãos governamentais, resultando em incessáveis discussões internacionais. As medidas efetivas para minimizar a exposição humana e animal, e as condições adequadas de produção e processamento dependem de rigoroso e eficiente programa de monitoramento em produtos agrícolas e animais (CHU, 1984; SCOTT & TRUCKSESS, 1997; ONO *et al.*, 2000; WHITAKER, 2003). O desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade, especificidade, viabilidade, rapidez, reprodutibilidade e facilidade de uso, além de exatidão e precisão, são essenciais na micotoxicologia para avaliar exposição humana e animal, e controle de qualidade de matérias primas agropecuárias e produtos derivados (CHU, 1984; SCOTT & TRUCKSESS, 1997; ONO *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; PETTERSSON & ABERG, 2003; van der GAAG *et al.*, 2003; WHITAKER, 2003).

No entanto, a diversidade na estrutura química inerente de micotoxinas dificulta a análise, exigindo desenvolvimento metodológico específico para cada grupo molecular, com nível de separação e diferenciação capaz de detectar análogos estruturalmente relacionados. Aliada a isto, a distribuição heterogênea de micotoxinas nos produtos agrícolas exige análise de um número significativo de amostras, visando minimizar a variabilidade estatística (DAVIS *et al.*, 1980).

O monitoramento perante presença de aflatoxina é crucial à segurança do consumidor (OTTA, *et al.*, 2000). O desenvolvimento de método único para detectar todas as

micotoxinas é impossível, devido à diversidade estrutural. Uma alternativa seria detectar os fungos micotoxigênicos no estágio inicial de crescimento, visando aplicar medidas de controle na fase anterior à produção de micotoxinas (YONG & COUSIN, 2001).

A contaminação por aflatoxina tem sido detectada em ampla variedade de alimentos e rações, sendo importante a disponibilidade e desenvolvimento de método simples e quantitativo para análise desta micotoxina. A etapa inicia-se empregando amostras 'aflatoxina-livre' (aflatoxina abaixo do limite de detecção) contaminadas com concentrações conhecidas de aflatoxina, seguida de extração, limpeza, separação e determinação quantitativa (PAPP *et al.*, 2002). Yong e Cousin (2001) inocularam esporos de *Aspergillus parasiticus* em amostras de milho e amendoim, incubaram em condições controladas (temperatura e umidade) e monitoraram a aflatoxina sintetizada após o aparecimento de fungos nas amostras pelo método ELISA.

Inúmeros métodos para determinação de aflatoxina têm sido desenvolvidos, citando-se métodos baseados em cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com absorção-UV, fluorescência, espectrometria de massa ou detecção amperométrica, cromatografia líquida (LC) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (GARDEN & STRACHAN, 2001; STROKA & ANKLAM, 2002; AMMIDA *et al.*, 2004).

A análise cromatográfica é amplamente aceita como método oficial de determinação de aflatoxina (KOLOSOVA *et al.*, 2006), cujo propósito é confirmar positividade de amostras que demonstram conter micotoxinas em testes de triagem, além de proporcionar aumento de exatidão na quantificação de toxina presente (CAST, 2003). Os métodos mais difundidos para determinação quantitativa de aflatoxina em diferentes amostras são CCD e CLAE (LEE *et al.*, 2004; KOLOSOVA *et al.*, 2006).

Apesar de ser um método de referência, a CCD é freqüentemente utilizada como ensaio de triagem de micotoxina (CAST, 2003). Esta metodologia é relativamente econômica e requer pouco equipamento para determinação de aflatoxina, mas fornece variação entre as análises, já que a quantificação se faz por estimativa visual (LEE *et al.*, 2004; KOLOSOVA *et al.*, 2006). É uma poderosa ferramenta para determinar presença de uma ou mais micotoxinas em uma amostra, permitindo quantificação crítica e utilização de densitômetro. A quantificação densitométrica conduzida em CCD é mais exata quando os compostos analisados são coloridos ou fluorescentes, não necessitando revelação para visualização dos *spots* (CAST, 2003). Stroka e Anklam (2000) descreveram o desenvolvimento de um densitômetro simples, pequeno, de baixo consumo de energia, para quantificação de aflatoxina em CCD. Frequentemente, a técnica de CCD pode ser utilizada

com pouca ou nenhuma etapa de limpeza prévia à aplicação do *spot* na placa cromatográfica (CAST, 2003). Stroka *et al.* (2000b) reportaram o uso de CIA comercial para limpeza de amostra antes da aplicação em placa de CCD, com quantificação e identificação de aflatoxina por densitometria. Em alguns casos, a CCD de duas dimensões (2D-CCD) pode ser utilizada para determinação de micotoxinas em amostras extremamente sujas (CAST, 2003). O uso de 2D-CCD e CCD de alta eficiência (HPTLC) têm sido reportado para determinação de aflatoxina (PAPP *et al.*, 2002).

A CLAE é o método mais amplamente utilizado para análise de micotoxina, cuja detecção revela razoavelmente baixos níveis de contaminação e alta sensibilidade, implicando em método quantitativo de boa qualidade (CAST, 2003). A aflatoxina pode ser separada e detectada utilizando tanto CLAE normal como o de fase reversa. Este método cromatográfico possibilita utilização de uma variedade de estratégias para detecção, i.e. reação pós-coluna com iodo ou bromo acoplado com detecção de fluorescência, absorção UV, espectrometria de massa, detecção amperométrica, com diferentes processos de limpeza como extração em fase sólida (SPE), *supercritical-fluid extraction* (SFE), *matrix solid-phase dispersion* (MSPD) e cromatografia por afinidade (PAPP *et al.*, 2002; EDINBORO & KARNES, 2005; KOLOSOVA *et al.*, 2006). CLAE utilizando detecção de fluorescência tem se tornado o método mais aceito para determinação de aflatoxina devido ao alto grau de separação e menor tempo de análise. Métodos de fase reversa utilizando detecção de fluorescência e UV também têm sido desenvolvidos. A sensibilidade da metodologia pode ser aumentada pela reação de derivatização (OTTA *et al.*, 2000).

A cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (LC-MS) tem sido relatada como alternativa sensível e específica para métodos espectrofotométricos, sem necessidade de manipulação de pós-colunas (EDINBORO & KARNES, 2005).

Dentre as desvantagens dos métodos cromatográficos estão a dependência de laboratórios com equipamentos especializados, operadores treinados, uso de solventes tóxicos e demora na obtenção de resultados (GARDEN & STRACHAN, 2001; AMMIDA *et al.*, 2004; KOLOSOVA *et al.*, 2006), a exemplo de análise em CLAE que necessita de extensivo processo de limpeza e derivatização de amostra para melhorar a sensibilidade de detecção (LEE *et al.*, 2004).

Além disso, a análise cromatográfica de aflatoxina é precedida por uma seqüência de operações amplas e complexas, que incluem amostragem, preparo de amostra, extração, purificação e concentração de extrato obtido antes da separação, quantificação e

etapas de confirmação. Os resultados de quantificação e etapas de identificação são determinados pela efetividade obtida nas operações gerais (JAIMEZ *et al.*, 2000).

Novos métodos para detecção de aflatoxina têm sido propostos, como aplicação de biosensores de ressonância plásmica de superfície (*surface plasmon resonance biosensors*), monitoramento de injeção de fluxo (*flow injection monitoring*), sensores de fibra óptica (*fibre optic sensors*), eletrocinética capilar (*capillary electrokinetics*) e transdução eletroquímica (*electrochemical transduction*). Imunossensores geralmente referem-se ao sistema que acopla material imunoativo ao transdutor para gerar sinal elétrico proporcional à quantidade de analito presente, empregando antígenos ou anticorpos imobilizados na superfície sensora do transdutor. Imunossensores pequenos, semi-automáticos e portáteis estão sendo desenvolvidos com o objetivo de separar com rapidez (GARDEN & STRACHAN, 2001; AMMIDA *et al.*, 2004; KOLOSOVA *et al.*, 2006). A principal limitação do uso de biosensores é a regeneração de superfície do receptor (KOLOSOVA *et al.*, 2006).

Em termos de análise de aflatoxina sem utilização de clorofórmio, procedimentos altamente bem-sucedidos têm sido publicados, utilizando, na maioria dos casos, amostras de leite e fluídos biológicos. Por outro lado, foi reportado um método oficial de aflatoxina (AOAC) em alimentos usando coluna multifuncional (MFC), que permite passagem de aflatoxina e retém substâncias interferentes (JAIMEZ *et al.*, 2000; AKIYAMA *et al.*, 2001). Akiyama *et al.* (2001) desenvolveram método de limpeza rápido e sensível com coluna multifuncional comercial, utilizando LC acoplada à detecção por fluorescência para análise de aflatoxina em cereais, nozes e milho.

Mesmo utilizando métodos de extração, o extrato obtido ainda contém, além de aflatoxina, várias impurezas (lipídeos, pigmentos), necessitando de etapas de limpeza adicionais (PAPP *et al.*, 2002).

A aflatoxina é solúvel em alguns solventes polares e completamente insolúvel em solventes apolares (JAIMEZ *et al.*, 2000). Os solventes mais comumente utilizados para extração são misturas de clorofórmio-água, metanol-água ou acetonitrila-água, cuja combinação humidifica o substrato, resultando em aumento da penetração de solvente orgânico na amostra e melhora da extração de aflatoxina (JAIMEZ *et al.*, 2000; PAPP *et al.*, 2002; BLESA *et al.*, 2003). Para limpeza e purificação de extrato bruto, o uso de colunas de imunoafinidade ou mini-colunas de extração em fase sólida (SPE) tem sido relatado para substituir procedimentos de partição líquido-líquido e o tradicional uso de coluna cromatográfica. A técnica de extração mais utilizada é a SPE, sendo a sílica gel, C₁₈ fase-ligada e silicato de magnésio (comercializado como florissil) as fases estacionárias mais

comuns. (PAPP *et al.*, 2002; BLESA *et al.*, 2003). Outros tipos de colunas de SPE são coluna multifuncional Mycosep, que ao contrário das outras permite passagem de micotoxina e retém substâncias interferentes, e coluna de imunoafinidade (JAIMEZ *et al.*, 2000).

Embora as técnicas analíticas convencionais (CLAE, CCD, CG) sejam oficialmente aceitas e validadas, a exigência de extrema limpeza de amostra, demanda considerável de reagentes com alto grau de pureza destinados a derivatização e análise cromatográfica, instabilidade de derivatizados fluorescentes, e alto custo de instrumentação e manutenção sob supervisão de técnicos especializados, restringem o uso em rotina laboratorial (CHU, 1984; CHU *et al.*, 1988; PESTKA *et al.*, 1995; BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996; SYDENHAM *et al.*, 1996).

Em vista a estas dificuldades, o ensaio imunoquímico constituiu técnica analítica alternativa promissora na análise de micotoxinas em alimentos, a exemplo o ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). O ELISA possui vantagens sobre outros procedimentos pela simplicidade, alta sensibilidade de reações imunológicas capaz de detectar concentrações traço de um composto (pg), pouca ou nenhuma necessidade de limpeza ou concentração de analito, baixo custo após padronização, facilidade de operação, uso de reagentes seguros, rapidez, adaptabilidade, seletividade, além do potencial de aplicação diagnóstica de rotina (GAZZAZ *et al.*, 1992; HEFLE, 1995; PESTKA *et al.*, 1995; VALENTA, 1998; CHIAVARO *et al.*, 2001; AMMIDA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; XIULAN *et al.*, 2005; KOLOSOVA *et al.*, 2006). A desvantagem desta técnica limita-se a determinados tipos de alimentos em vista ao efeito de matriz alimentar, que resulta em interferência nas reações imunológicas, i.e. interações inespecíficas de anticorpo a componentes alimentares (proteínas, ácidos graxos), ou bloqueio estérico da ligação entre anticorpo e analito, que superestimariam a concentração de micotoxina na aplicação de ELISA competitivo indireto, ou seja, reação falso-positiva (PESTKA *et al.*, 1994, 1995; HEFLE, 1995; BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996). A interferência de matriz pode ser minimizada por meio de diluição de amostra previamente à realização do ensaio, ou pela inclusão de processo simples de limpeza (PESTKA *et al.*, 1994; BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996; ONO *et al.*, 2000; SASAKI, 2000; FUJII, 2002). Deve-se considerar também o efeito de precursores de micotoxinas ou produtos oriundos do metabolismo fúngico, capazes de interferir na reação imunológica (SASAKI, 2000).

Métodos fluorimétricos simples associados à etapa de limpeza em CIA têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a velocidade de execução a um menor custo. Tais métodos são baseados em simples medida fluorimétrica de extrato purificado contendo

aflatoxina. A validação intra-laboratorial desta metodologia tem demonstrado precisão de parâmetros comparável ao fornecido pelo método de CLAE. No entanto, matrizes complexas podem gerar falso-positivos devido a reações cruzadas e interferência de matriz alimentar (STROKA & ANKLAM, 2002). Aghamohammadi *et al.* (2007) reportaram o uso de espectrometria de fluorescência sincronizada (*Synchronous Fluorescence Spectrometry*), técnica convencional de fluorescência com simples modificação, e espectrofluorimetria normal em combinação com métodos de calibração multivariada e técnicas de derivatização, para determinar AFB₁ em amostras de pistache.

2.3 COLUNA DE IMUNOAFINIDADE PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA

A técnica de cromatografia por afinidade pode ser considerada como inovação na área de metodologia analítica, essencialmente baseada em procedimentos químicos, por introduzir componente biológico (anticorpo) como reagente principal na análise (OSTROVE, 1990; SCOTT & TRUCKSESS, 1997; HOLTZAPPLE *et al.*, 2001; CONG *et al.*, 2002; KONDO *et al.*, 2002; SHELVER *et al.*, 2002; JURADO & JARRET, 2003; TAVČAR-KALCHER *et al.*, 2007).

A incorporação de procedimentos biológicos, i.e. coluna de imunoafinidade (CIA), à metodologia química analítica consistiu em alternativa promissora às técnicas convencionais de limpeza na análise de micotoxinas, conferindo rapidez e especificidade na etapa do preparo de amostra (HOLTZAPPLE *et al.*, 2001; WATANABE *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2003), além de fornecer extratos com alta pureza que podem ser quantificados por modernos e sensíveis métodos de detecção (BRADBURN & COKER, 1995).

A coluna de imunoafinidade (CIA), preparada com anticorpo anti-micotoxina, destaca-se por proporcionar simplicidade, alta especificidade e recuperação, melhorando limites de detecção e possibilitando análise de variedade de compostos em distintas matrizes complexas. Uma vantagem incontestável também está na utilização de tampão, dispensando emprego de grandes volumes de solventes tóxicos durante o preparo, além da possibilidade de automação da técnica e disponibilidade comercial (OSTROVE, 1990; SCOTT & TRUCKSESS, 1997; OTTA *et al.*, 2000).

A técnica de imunoafinidade possibilita análise de matrizes alimentares utilizando etapa única de extração, sem empregar solventes hidrocarbono-halogenados

(OTTA *et al.*, 2000). Os procedimentos de limpeza de amostra por imunoafinidade melhoram não apenas o desempenho, devido à provisão de extratos extremamente limpos (ausência de substâncias interferentes), mas também facilitam a determinação de aflatoxina, desde que a automação seja aplicável (STROKA & ANKLAM, 2002).

As colunas compõem-se de suporte de fase sólida ativada, a exemplo de *Sepharose*[®]-CNBr, onde se imobilizam os anticorpos específicos contra determinada micotoxina (SCOTT & TRUCKSESS, 1997; HOLTZAPPLE *et al.*, 2001; WATANABE *et al.*, 2001; CONG *et al.*, 2002; KONDO *et al.*, 2002; SHELVER *et al.*, 2002; JURADO & JARRET, 2003; ZHAO *et al.*, 2003). O processo de limpeza consiste na ligação seletiva de micotoxina presente no extrato aos anticorpos da coluna, seguido de eluição com solvente apropriado (Figura 5). A imobilização dos anticorpos à matriz da coluna e a afinidade do analito ao anticorpo específico durante a limpeza, lavagem e condições de eluição da amostra são fatores determinantes da eficiência e aplicabilidade da CIA (SHELVER *et al.*, 2002).

O uso de colunas de imunoafinidade tem sido relatado para extração de aflatoxina de matrizes biológicas e não biológicas, a exemplo de coluna de imunoafinidade utilizando anticorpo monoclonal (AcM) covalentemente ligado a esferas de agarose para fornecer extração seletiva de componentes interferentes de matriz (EDINBORO & KARNES, 2005).

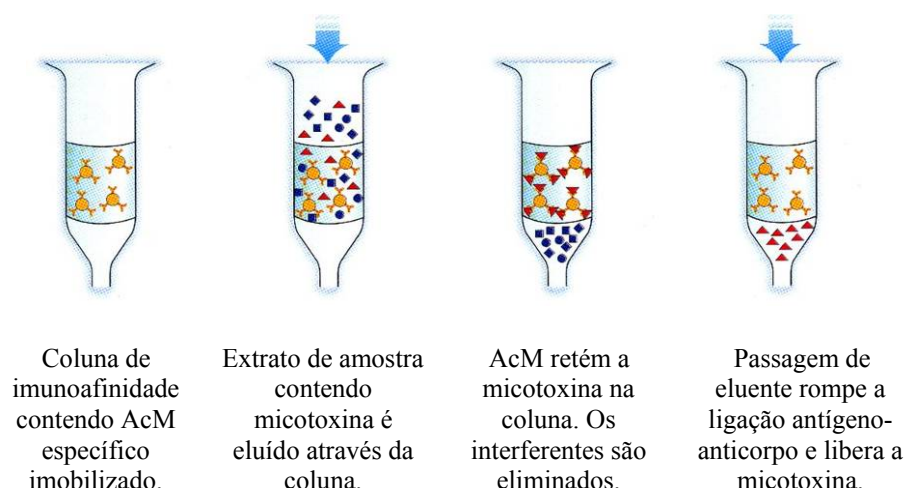
A aplicabilidade de cromatografia por afinidade vem sendo amplamente difundida na análise de micotoxinas inerentes de matrizes complexas, a exemplo de ocratoxina A em café (ENTWISLE *et al.*, 2001; SIBANDA *et al.*, 2002), vinho (LEITNER *et al.*, 2002; STANDER E STEYN, 2002), e cerveja (VISCONTI *et al.*, 2000); aflatoxina em ração (SHARMA E MÁRQUEZ, 2001), produtos lácteos (DRAGACCI *et al.*, 2001), alimentos infantis (STROKA *et al.*, 2001), amendoim e páprica (STROKA *et al.*, 2000a, 2000b); fumonisina em milho e produtos derivados (CHENG *et al.*, 2002); tricoteceno em pipoca e milho (OLIVEIRA *et al.*, 2001; PASCALE *et al.*, 2003), trigo, cevada e malte (TACKE & CASPER, 1996; PASCALE *et al.*, 2003), arroz, aveia e sorgo (PASCALE *et al.*, 2003); zearalenona em cereais e rações (FAZEKAS & TAR, 2001) e microcistina em água (KONDO *et al.*, 2002, 2000; AGUETE *et al.*, 2003).

A coluna de imunoafinidade Aflatest, acoplada à fluorimetria ou cromatografia líquida com derivatização pós-coluna, tem sido adotada como método oficial de primeira escolha (*Official First Action Method*) pela AOAC para determinação de aflatoxina total (≥ 10 ng/g) em milho, amendoim cru e pasta de amendoim (BRADBURN & COKER, 1995).

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

Embora exista a disponibilidade comercial de CIA para análise de micotoxina em diferentes matrizes, o alto custo tem exigido novas opções de suporte e possibilidade do preparo de coluna a partir da produção de anticorpo monoclonal e policlonal específico, bem como o uso de suportes adequados (SCOTT & TRUCKSESS, 1997; ENTWISLE *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2003; NAKANO & NAGATA, 2003).

A desvantagem referente ao alto custo de CIA comercial tende a ser minimizada aplicando processo de regeneração adequado à coluna, capaz de permitir reutilização sem perda significativa na atividade, reduzindo o custo de análise (NAKAJIMA *et al.*, 1990; SCOTT & TRUCKSESS, 1997; FAZEKAS & TAR, 2001; WATANABE *et al.*, 2001; KONDO *et al.*, 2002).



(Fonte: R-BIOPHARM RHÔNE Ltd., USA)

Figura 5 – Procedimento de limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade.

2.4 ANTICORPO PARA TÉCNICAS IMUNOQUÍMICAS

Inicialmente, as técnicas imunoquímicas foram padronizadas empregando-se anticorpos policlonais usualmente produzidos em coelhos ou carneiros (THIMURALA *et al.*, 2000). Entretanto, a produção de grande quantidade de anticorpos policlonais apresenta limitações, requerendo fornecimento contínuo de antígeno purificado para as inoculações, manutenção de biotérios, variabilidade individual do animal na qualidade de anti-soro ou no mesmo animal devido ao intervalo de sangria (WYATT, 1992). A produção de anticorpo monoclonal superou o problema, obtendo-se reagente uniforme, de alta qualidade, passível de ser empregado na rotina laboratorial (KOBAYASHI *et al.*, 2003; NAKANO & NAGATA, 2003).

A qualidade de anticorpo (alta afinidade e especificidade, baixa reatividade cruzada) é essencial para o desenvolvimento de imunoenaios sensíveis na micotoxicologia, já que estes se baseiam na interação específica entre antígeno-anticorpo (GAZZAZ *et al.*, 1992; HEFLE, 1995; BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996; KOBAYASHI *et al.*, 2003; NAKANO & NAGATA, 2003). A obtenção de anticorpo de alta qualidade depende de imunógenos purificados, protocolo de imunização e critério para seleção de anticorpo monoclonal específico (NEWSOME, 1986; HEFLE, 1995; BARNA-VETRÓ *et al.*, 1996). Os anticorpos monoclonais caracterizam-se pela uniformidade, alta especificidade e afinidade constante a

um único epítopo, sendo homogêneos na estrutura e especificidade, características estas essenciais na identificação de antígenos em matrizes complexas (GAZZAZ *et al.*, 1992; DIETRICH *et al.*, 1995; HEFLE, 1995).

A produção de anticorpo monoclonal envolvendo etapas de imunização de animais, fusão de células sensibilizadas (produtoras de anticorpos) com células de mieloma, cultivo e clonagem de hibridomas, tornou-se instrumento essencial na medicina e indústria, conferindo a Milstein e Köhler, o Prêmio Nobel de Medicina em 1984 (MORO & RODRIGUEZ, 2001).

A tecnologia de hibridoma permitiu o fornecimento ilimitado de AcM com especificidade definida, obtido pela imunização de camundongo com antígeno específico, seguido de fusão de célula esplênica secretora de anticorpo com célula de mieloma (Figura 6) (HARLOW & LANE, 1988a). No passado, AcM era produzido apenas em líquido ascítico, cujo método é limitado para produção em rato ou camundongo. A implementação de tecnologia *in vitro* foi estimulada por razões éticas e pelo fato de que AcM humano não pode ser produzido em animais (HEILMANN *et al.*, 2005). No entanto, a produção de IgG anti-AFB₁ pelo cultivo de hibridoma procede-se em meio sintético de composição definida (*in vitro*), a exemplo de RPMI 1640 e DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), meios mais comumente utilizados, ou na cavidade peritoneal de camundongo (HARLOW & LANE, 1988b; EVEN *et al.*, 2006).

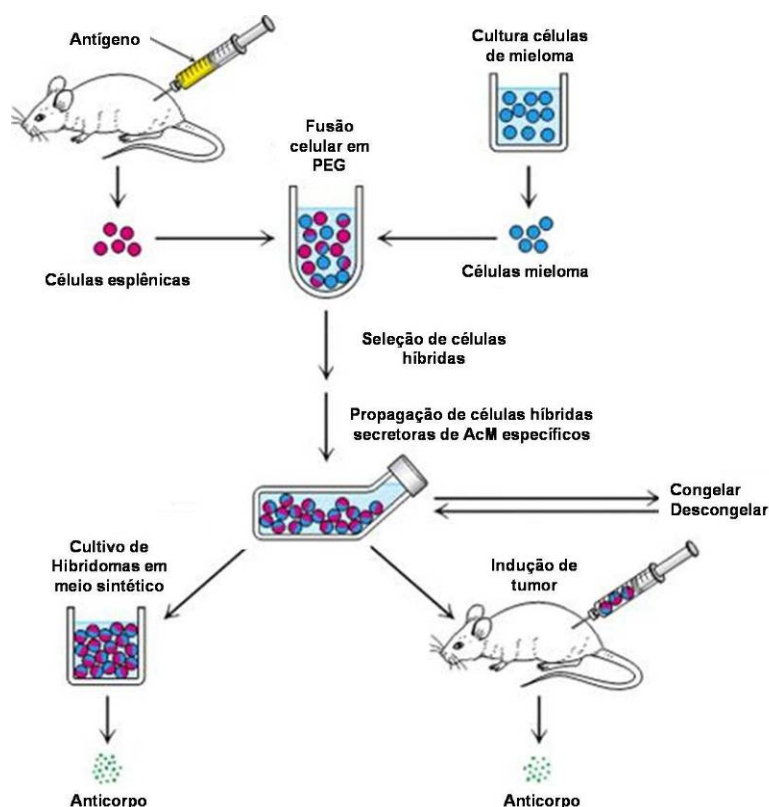
Micotoxinas e ficotoxinas mostram-se incapazes de estimular o sistema imune para produzir anticorpo devido à estrutura relativamente pequena (haptenos). Não obstante, as moléculas tornam-se imunogênicas procedendo à conjugação com proteínas carreadoras de alta massa molecular, empregando sistema de ativação adequado que garanta manutenção de grupos determinantes de identidade do hapteno (CHU, 1984; NEWSOME, 1986; KAWAMURA *et al.*, 1988; GAZZAZ *et al.*, 1992; HEFLE, 1995; XIAO *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2003). Conseqüentemente, o preparo de antígeno para imunização (hapteno) requer suporte peptídico pouco imunogênico para obtenção de anticorpo monoclonal e policlonal específicos (DANILOVA, 1994; TUOMOLA *et al.*, 2000; MOGHADDAM *et al.*, 2001; MORAN *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2003).

A seleção de proteína carreadora e método de conjugação para síntese de imunógeno representa etapa crítica na produção de anticorpos específicos (DANILOVA, 1994; TUOMOLA *et al.*, 2000; MORAN *et al.*, 2002). Entre os carreadores e adjuvantes citam-se albumina de soro bovino (BSA), *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) e ovoalbumina (OVA) (KAWAMURA *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 2003). A AFB₁ precisa ser primeiramente

convertida em Afla B₁-O-carboximetil-oxime (Afla B₁-oxime) devido ao fato de não dispor de grupo reativo para reações de acoplamento (Figura 7), introduzindo-se um grupo carboxílico livre, por meio de derivatização, para reagir covalentemente com a molécula de proteína (Figura 8) (CHU & UENO, 1977).

Um cuidado especial deve ser considerado no emprego de reagentes imunológicos (material biológico), cujo componente fundamental, a imunoglobulina, apresenta baixa estabilidade com possível perda de reatividade. Em relação ao método químico convencional, a manutenção adequada dos reagentes torna-se fator decisivo na confiabilidade da reação, devendo-se evitar ao máximo a desnaturação protéica (DAUPHINAIS, 1986; NEWSOME, 1986; HEFLE, 1995).

A produção de anticorpos anti-AFB₁ tem permitido o desenvolvimento de uma variedade de métodos baseados em Acs, i.e. imunoensaio acoplado à detecção colorimétrica (GARDEN & STRACHAN, 2001; XIULAN *et al.*, 2005) ou eletroquímica (AMMIDA *et al.*, 2004), e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (PAL & DHAR, 2004; LEE *et al.*, 2004; SAPSFORD *et al.*, 2006).



(Fonte: BERG *et al.*, 2002)

Figura 6 – Produção de AcM: imunização de camundongo, fusão celular, obtenção de hibridomas e cultivo em meio sintético de composição definida e na cavidade peritoneal de camundongo.

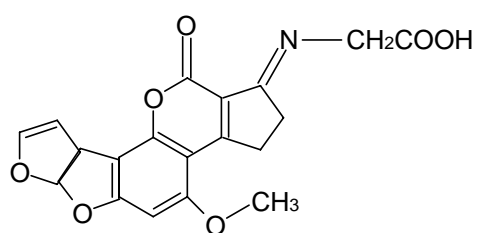


Figura 7 – Estrutura de AFB₁-oxime.

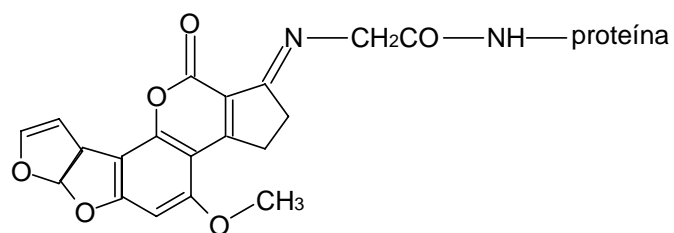


Figura 8 – Ligação de AFB₁-oxime à proteína.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpo monoclonal anti-aflatoxina B₁ (AFB₁) empregando hibridoma AF4, fornecido pelo intercâmbio com grupo japonês, para atender controle de qualidade de alimentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Cultivar e manter hibridoma linhagem AF4, secretor de AcM IgG específico para AFB₁;
- ◆ Produzir IgG anti-AFB₁ procedendo ao cultivo de hibridoma AF4 em meio sintético;
- ◆ Desenvolver CIA empregando IgG anti-AFB₁ e suporte gel ativado;
- ◆ Aplicar método rápido e simples de detecção de aflatoxina utilizando espectrofluorimetria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As metodologias que apresentaram melhores resultados no decorrer dos experimentos foram descritas a seguir.

4.1 MATERIAL

AcM anti-AFB₁ (122% de reatividade cruzada com aflatoxicol); AFB₁ padrão, PBS (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); DMSO (Trade TCI, Japan); microplaca de 24 orifícios, criotubo (Corning, USA); filtro de microfibra de vidro (GF/C 2,5 cm i.d), filtro qualitativo nº 1 (Whatman International Ltd., Maistone, England); CIA Aflatest-P (VICAM Inc., Watertown, USA); meio RPMI 1640, soro fetal bovino, *Hybridoma*-SFM (*serum free medium*), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, L-glutamina, sulfato de amônio (Gibco Co., USA); frascos para cultivo de células de 25, 75 e 150 cm² (Nunc, Denmark); corante vital Azul de Trypan (Acros Organics, New Jersey, USA); *Activated Immunoaffinity Supports Affi-Gel 10* (Bio-Rad, 153-6046, USA); freezer (-20° C) (CFC FREE, Sanyo, USA); recipiente de nitrogênio líquido (-185° C) (Cryo Diffusion, France); incubadora sob 5 % CO₂ (Forma Scientific, USA); BOD (TE-391, Tecnal, Brasil); espectrofotômetro UV-VIS Cintra 20 (GMB, Brasil); espectrofluorímetro (Varian, Cary-Eclipse, Australia); sistema *Stirred Cell 8400*, membrana de exclusão molecular de 100 Kda (YM 100, celulose) (Millipore Co., Bedford, MA, USA); banho ultrassônico (*Ultrasonic cleaner Unique*); água ultra-pura (*Ultra Purê Water System Milli-Q plus*, Millipore Corp., Bedford, MA, USA); centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, 3805 03551, Germany); moinho A10 (Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Germany).

4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL IGG ANTI-AFB₁

4.2.1 Linhagem de célula de hibridoma

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

Camundongo BALB/c foi imunizado com conjugado AFB₁-BSA e as células esplênicas obtidas foram fundidas com células de mieloma (linhagem SP2/0-AG14). Os hibridomas foram selecionados em meio HAT (meio *Dulbecco's modified Eagle's*, contendo 100 µM de hipoxantina, 0,4 µM de aminopterina e 16 µM de timidina) e triados por ELISA não-competitivo indireto quanto à presença de AcM anti-AFB₁. Os clones positivos foram clonados por método de diluição limitante e expandidos em meio de cultura, com posterior preservação em nitrogênio (N₂) líquido (-185° C).

O hibridoma AF4, secretor de AcM IgG₁ anti-AFB₁, foi selecionado com base no melhor perfil quanto à especificidade pela AFB₁ e menor reatividade contra as demais aflatoxinas, e encaminhado ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, UEL – PR).

4.2.2 Recepção e cultivo de hibridoma

Um cultivo celular de células de hibridoma AF4 foi gentilmente fornecido por Dr. Osamu Kawamura (*Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão*) para continuidade de estudo no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCA, UEL – PR.

Imediatamente após a recepção, as células híbridas foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia (Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL – PR) para prosseguir com a reativação e cultivo. Os hibridomas foram

reativados em meio RPMI 1640 (RPMI) suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) em microplacas de 24 orifícios, a 37° C, em incubadora de CO₂ (5 % CO₂) com monitoramento diário de crescimento celular por microscopia. Após a reativação, as células foram expandidas em frascos de cultivo de 25 e 75 cm² utilizando meio RPMI com 10 % de SFB (HARLOW & LANE, 1988b; KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*).

4.2.3 Contagem e análise de viabilidade celular

A contagem e viabilidade de hibridoma foram avaliadas microscopicamente utilizando corante vital Azul de Trypan. Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi combinada a 100 µL da solução de corante (0,25 % em meio RPMI, p/v) e as células viáveis (aptas a excluir corante, i.e. refringentes, com citoplasma homogêneo e membrana íntegra) foram contadas em câmara de contagem Neubauer em microscópio óptico.

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

4.2.4 Manutenção e recuperação de hibridoma

As células viáveis de hibridoma reativadas e expandidas em meio RPMI com 10% de SFB foram preservadas em nitrogênio líquido (-185° C) utilizando SFB contendo agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 9:1 (v/v) (HARLOW & LANE, 1988b; KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*). As células foram centrifugadas (200 x g – 5 min), ressuspendidas e incubadas em meio fresco (RPMI com 10 % SFB) por 24 horas, para atingir a fase log de crescimento. Em seguida, as células foram centrifugadas (200 x g – 5 min) e ressuspendidas em solução de SFB:DMSO (9:1) resfriada a 4° C. Alíquotas de 0,5 mL desta suspensão contendo 2,5 x 10⁶ a 2,5 x 10⁷ células viáveis foram adicionadas em criotubos e mantidas a -70° C por 16 horas, sendo posteriormente transferidas para um recipiente contendo N₂ líquido (-185° C).

Previamente ao uso, os hibridomas estocados a -185°C em nitrogênio líquido foram recuperados por descongelamento rápido do criotubo em banho de água a 37°C , lavados com 15 mL de meio RPMI a 37°C e centrifugados ($200 \times g - 5 \text{ min}$). Descartado o sobrenadante, as células foram avaliadas microscopicamente com corante vital Azul de Trypan e a viabilidade celular pós-congelamento foi calculada e expressa como porcentagem:

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

Em seguida as células foram ressuspendidas em meio RPMI com 10 % SFB, e cultivadas em microplaca de 24 orifícios a 37°C em incubadora de CO_2 (5 %). Posteriormente, procedeu-se a expansão celular para frascos de cultivo de 25 e 75 cm^2 .

4.2.5 Produção de AcM IgG a partir de cultivo de hibridoma em meio sintético

Os hibridomas foram cultivados inicialmente em meio RPMI suplementado com 10 % SFB (37°C , 5 % de CO_2), seguido de adaptação gradual ao meio *Hybridoma*-SFM (H-SFM) suplementado com 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, por adição de 25, 50, 75 e 100 % deste meio ao RPMI (BRUCE *et al.*, 2002; KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*). Após adaptação, as células foram cultivadas em frascos de 150 cm^2 com inóculo inicial de 2,5 a 5×10^4 células/mL até atingirem saturação celular (aproximadamente 5×10^5 a 1×10^6 células/mL) e então removidas por centrifugação ($200 \times g$, 5 min). Em seguida, as células foram ressuspendidas em meio fresco e incubadas a 37°C com 5 % CO_2 . O volume celular foi ajustado com o meio para obter a concentração celular desejada.

A produção de anticorpos monoclonais foi realizada em cultivo estático, em meio com concentração celular de 1×10^6 células/mL. As células foram incubadas por aproximadamente 15 dias, sem reposição de meio, até morte celular. O sobrenadante de cultivo contendo os anticorpos monoclonais IgG anti-AFB₁ foi armazenado a 4°C , após centrifugação ($2400 \times g$, 10 min, 4°C) para remover células e material celular.

4.2.5.2 Determinação de proteína (IgG)

A concentração de proteínas (IgG) foi determinada por absorção a 280 nm em espectrofotômetro, adotando coeficiente de absorção (E_{280}) de 1,35 para IgG (HARLOW & LANE, 1988e):

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

4.2.6 Purificação parcial de anticorpo monoclonal IgG anti-AFB₁

Anticorpo monoclonal IgG anti-AFB₁ produzido pelo cultivo de hibridoma AF4 foi previamente submetido à concentração por ultrafiltração (sistema *Stirred Cell* 8400, Millipore Co.) utilizando membranas de exclusão molecular de 100 Kda.

4.2.6.1 Precipitação de IgG com sulfato de amônio - (NH₄)₂SO₄

A solução concentrada de anticorpos foi adicionada de sulfato de amônio sob agitação lenta até concentração final de 40 % de saturação (243 g/L de sobrenadante) para precipitação e purificação parcial de IgG.

O precipitado protéico obtido foi mantido a 4° C por 16 horas sob agitação, centrifugado (8000 x g, 30 min, 4° C) e ressuspendido em PBS (tampão fosfato de sódio) (1/10 do volume original da amostra concentrada). Em seguida, a amostra ressuspendida foi dialisada (*cut-off* de 12000-16000 MM) empregando-se PBS (4 x 1 L) a 4° C por 16 horas, sob agitação. Após a diálise em PBS, a solução de anticorpos purificada foi submetida à outra diálise em água ultra-pura (4 x 1 L) para remoção de sais. A partir deste concentrado protéico determinou-se a concentração de IgG conforme item 4.1.5.1. A solução de anticorpos foi congelada (-20° C), liofilizada (-50° C) e mantida a -20° C.

(pH 8,0) por 1 hora para bloquear as regiões não acopladas com os anticorpos. O gel foi transferido para uma coluna e lavado com PBS até que a leitura a 280 nm não detectasse presença de reagentes.

4.3.2 Manutenção de CIA Affi-Gel 10

A coluna foi mantida a 4° C em PBS contendo 0,02 % de azida sódica (NaN₃). Previamente ao uso, metanol grau HPLC foi passado através da coluna para remover qualquer impureza solúvel neste solvente. Em seguida, a coluna foi reequilibrada imediatamente com PBS.

4.3.3 Avaliação da eficiência de acoplamento de AcM à CIA Affi-Gel 10

A eficiência de acoplamento de AcM ao suporte Affi-Gel 10 foi determinada por quantificação de anticorpos eluídos na etapa de lavagem da coluna por absorção a 280 nm após o período de imobilização entre ligante e gel (suporte). O pH da solução de proteínas remanescentes foi acidificado com solução de HCl 10 mM para evitar interferência de leitura de N-hidroxisuccinamida, que absorve a 280 nm em pH neutro ou básico.

4.3.4 Determinação da capacidade de retenção de AFB₁ em CIA Affi-Gel 10

A capacidade de retenção de AFB₁ em CIA Affi-Gel 10 desenvolvida foi determinada conforme Watanabe *et al.* (2001) modificado. Volume de 5 mL de AFB₁ (10 ng/mL) em água:metanol (21:4, v/v) foi continuamente adicionado à CIA sob fluxo de 1-2 gotas/seg. Duas frações (2,5 mL) foram coletadas e analisadas por espectrofluorimetria. A coluna foi lavada com 20 mL de água ultra-pura (1-2 gotas/seg). A AFB₁ ligada à CIA foi

eluída com duas frações (7,5 mL) de metanol (1-2 gotas/seg) e quantificada por espectrofluorimetria.

4.4 TESTE DE RECUPERAÇÃO DE AFB₁ EM CIA AFFI-GEL 10

A coluna de imunoafinidade confeccionada com o suporte Affi-gel 10 foi avaliada quanto à eficiência na limpeza e determinação de AFB₁ em milho, em comparação à CIA Aflatest-P (VICAM).

4.4.1 Contaminação de milho com AFB₁

Os grãos de milho utilizados (híbrido AG7000) foram colhidos na estação experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR, Londrina-PR), safra 2005. Cinquenta gramas de milho (48 *mesh*) foram artificialmente contaminados com solução padrão de AFB₁ (Sigma) (500 ng/mL em metanol) para as concentrações de 5, 15 e 30 ng AFB₁/g alimento. As amostras foram mantidas em repouso por 24 horas a 25° C, submetidas à extração e limpeza em CIA (CIA Affi-Gel 10 e CIA Aflatest-P) para posterior quantificação por espectrofluorimetria.

4.4.2 Extração de AFB₁ de milho contaminado

A extração procedeu-se conforme recomendação do manual da CIA comercial (Aflatest-P). A amostra de milho contaminada (50 g com granulometria de 48 *mesh*) foi adicionada de 5 g de NaCl e 100 mL de solução de metanol:água (80:20, v/v) e agitada por 1 minuto (175 rpm). O extrato foi filtrado em papel plissado (filtro qualitativo nº 1) e coletado em recipiente limpo.

4.4.3 Limpeza de extrato bruto pela CIA

O extrato bruto (10 mL) foi adicionado de 40 mL de água ultra-pura (diluição 1:4), filtrado (filtro de microfibras de vidro GF/C) e 10 mL do extrato diluído foram submetidos à limpeza pela CIA Affi-Gel 10 previamente preparada no item 4.3.1 e pela CIA Aflatest-P a um fluxo contínuo de 1-2 gotas por segundo. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL de água ultra-pura sob o mesmo fluxo (1-2 gotas/seg). A AFB₁ foi eluída da CIA Aflatest-P com 1,0 mL de metanol grau HPLC (1-2 gotas/seg) e da CIA desenvolvida com 2 frações de 7,5 mL.

4.4.4 Determinação de AFB₁ por espectrofluorimetria

O eluato coletado da CIA foi submetido à secagem sob fluxo de N₂ gasoso e o resíduo foi ressuscitado em 200 µL de metanol. Uma alíquota de 100 µL de amostra foi adicionada de 100 µL de revelador (solução aquosa de bromo 0,003 %, v/v) e quantificada por espectrofluorimetria a 360 nm de excitação e 420 nm de emissão, após 60 segundos.

4.4.5 Regeneração de CIA

Após o uso, as CIAs (Affi-Gel 10 e Aflatest-P) foram regeneradas conforme Nakajima *et al.* (1990) e avaliadas quanto à reutilização. As colunas foram lavadas com 5 mL de tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 8,5) contendo NaCl 0,5 M, seguido de 5 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4,5 contendo NaCl 0,5 M) e 5 mL de PBS. Após lavagem, as colunas foram estocadas a 4° C por 72 horas e reutilizadas sucessivamente para amostras de milho artificialmente contaminadas. A reutilização de CIA foi avaliada por espectrofluorimetria e expressa como porcentagem de recuperação de AFB₁ após cada reuso.

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE ESPECTROFLUORIMETRIA E CCD PARA ANÁLISE DE AFB₁

4.5.1 Contaminação de milho com AFB₁

A contaminação de milho procedeu-se conforme item 4.4.1. As amostras foram mantidas em repouso por 24 horas a 25° C, submetidas à extração e limpeza em CIA Aflatest-P para posterior quantificação por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrofluorimetria. Os grãos de milho (híbrido AG7000) foram colhidos na estação experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR, Londrina-PR), safra 2005.

4.5.2 Extração de AFB₁ de milho contaminado

A extração procedeu-se conforme item 4.4.2.

4.5.3 Limpeza de extrato bruto pela CIA

O extrato bruto (10 mL) foi adicionado de 40 mL de água ultra-pura (diluição 1:4), filtrado (filtro de microfibras de vidro GF/C) e 10 mL do extrato diluído foram submetidos à limpeza pela CIA Aflatest-P a um fluxo contínuo de 1-2 gotas por segundo. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL de água ultra-pura sob o mesmo fluxo (1-2 gotas/seg). A AFB₁ foi eluída com 1,0 mL de metanol grau HPLC (1-2 gotas/seg).

4.5.4 Quantificação de AFB₁ por espectrofluorimetria

O eluato coletado da CIA foi submetido à secagem sob fluxo de N₂ gasoso e o resíduo foi ressuspenso em 200 µL de metanol. Uma alíquota de 100 µL de amostra foi

adicionada de 100 μL de revelador (solução aquosa de bromo 0,003 %, v/v) e quantificada por espectrofluorimetria a 360 nm de excitação e 420 nm de emissão, após 60 segundos. Outra alíquota de 100 μL foi novamente seca sob fluxo de N_2 gasoso e ressuspendida em 100 μL de clorofórmio.

4.5.5 Determinação de AFB₁ por cromatografia em camada delgada (CCD)

Cem μL da amostra ressuspendida em clorofórmio foram aplicados em placa cromatográfica de sílica gel juntamente com 4 pontos de solução padrão de AFB₁ a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1,5; 2,5; 7,5 e 15 μL), a 2 cm da base. O cromatograma foi desenvolvido em cuba saturada contendo como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v) (GIMENO, 1979). A placa foi removida após desenvolvimento de 10 cm de corrida, deixando-a secar. O cromatograma foi observado em lâmpada de UV longa para verificar presença de AFB₁.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram compilados em capítulos listados abaixo:

- ♦ **ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B₁ PARA CONTROLE DE QUALIDADE EM ALIMENTO (CAPÍTULO I)**

- ♦ **ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B₁: *SCALE-UP*, PURIFICAÇÃO-PARCIAL E DESENVOLVIMENTO DA COLUNA DE IMUNOAFINIDADE (CAPÍTULO II)**

- ♦ **COLUNA DE IMUNOAFINIDADE PARA ESPECTROFLUORIMETRIA: DETECÇÃO DE AFB₁ EM MILHO PELA CIA COMERCIAL VERSUS CIA AFFI-GEL 10-AcM ANTI-AFB₁ DESENVOLVIDA (CAPÍTULO III)**

CAPÍTULO I

ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B₁ PARA CONTROLE DE QUALIDADE EM ALIMENTO

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de anticorpo monoclonal IgG anti-AFB₁

A produção de anticorpo monoclonal (AcM) IgG anti-AFB₁ foi conduzida pelo cultivo de hibridoma AF4, gentilmente fornecido por Dr. Osamu Kawamura, *Kagawa University*, Japão (item 4.2).

Recepção e cultivo de hibridoma

O hibridoma AF4 foi recepcionado e reativado em meio RPMI 1640 (RPMI) suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) (item 4.2.2).

Contagem e análise de viabilidade celular

A contagem e viabilidade de hibridomas foram avaliadas microscopicamente utilizando corante vital Azul de Trypan (item 4.2.3).

Manutenção e recuperação de hibridoma

As células viáveis de hibridoma reativadas e expandidas em meio RPMI com 10% de SFB foram preservadas em nitrogênio líquido (-185° C) utilizando SFB contendo agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 9:1 (v/v) (item 4.2.4).

Produção de AcM IgG a partir de cultivo de hibridoma em meio sintético

O AcM IgG anti-AFB₁ foi produzido cultivando o hibridoma AF4 em meio RPMI e posteriormente em meio *Hibridoma-SFM* (H-SFM) (item 4.2.5).

Determinação de proteína (IgG)

A concentração de proteínas (IgG) foi determinada por absorção a 280 nm (item 4.2.5.1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

O AcM produzido pelo hibridoma AF4 reagiu tão bem com AFB₁ quanto com AFL II (isômero natural [1R]-aflatoxicol) (Figura 10), demonstrando reatividade cruzada de 122 % (KAWAMURA *et al.*, 1988) (Tabela 1).

Um cultivo de hibridoma AF4, correspondente a 5×10^5 células, foi cedido para pesquisa colaborativa na Universidade Estadual de Londrina – PR. A Figura 11 esquematiza o fluxograma desde a recepção do hibridoma AF4 até a produção de AcM anti-AFB₁, como produto final de cultivo em meio sintético H-SFM.

As células híbridas recebidas no Laboratório de Imunologia (Depto. Ciências Patológicas, CCB-UEL) foram imediatamente reativadas em meio RPMI suplementado com 20 % de SFB a 37° C (5 % de CO₂). Após reativação, as células foram expandidas em frascos de 25 e 75 cm² (RPMI com 10% SFB) e encaminhadas ao Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA), CCA-UEL. As células foram imediatamente acondicionadas em meio RPMI, aumentando SFB para 20% para adaptação, e incubadas a 37° C (5% de CO₂) (Figura 11, Exp. 1). As células não se adaptaram à nova condição de cultivo, ocorrendo morte celular gradativa no decorrer de 3 dias (alteração morfológica, membrana celular granulada). Após centrifugação, procedeu-se cultivo aumentando a quantidade de SFB para 40%, mas mesmo assim não reduziu a mortalidade. Considerando a debilidade celular, enriqueceu-se o meio de cultura com 2 mM de L-glutamina. Obteve-se êxito na adaptação celular, recuperando a característica morfológica, i.e. célula refringente com membrana lisa, confirmando que a suplementação com SFB e L-glutamina foi essencial na recuperação celular. A L-glutamina é um importante substrato para célula de hibridoma. Parte deste aminoácido é deaminada, liberando amônia e glutamato, e depois é transformada em outros aminoácidos com o propósito de biossíntese. A glucose também é fundamental para o crescimento de hibridoma, constituindo uma das principais fontes de carbono e energia, sendo utilizada também para síntese de biomassa (LEGAZPI *et al.*, 2005).

O soro fetal bovino tem sido utilizado como estimulante para o crescimento de hibridoma na rotina, por fornecer fatores hormonais e proteínas carreadoras de hormônios, minerais, lipídeos e outros compostos essenciais (LIDDELL & CRYER, 1991; HARLOW & LANE, 1988b; LEGAZPI *et al.*, 2005). Além disso, o baixo conteúdo de IgG no soro minimiza interferência durante ensaios e purificação de AcM (HARLOW & LANE, 1988b). A L-glutamina destaca-se como estimulante da produção de anticorpo monoclonal *in vitro* (BRUCE *et al.*, 2002; LEGAZPI *et al.*, 2005; HEILMANN *et al.*, 2005). Legazpi *et al.* (2005) aumentaram a concentração final de IgG₁ anti-lactoferrina bovina no fator de 2 vezes, adicionando 1,4 mM de glutamina ao meio livre de SFB. A alta especificidade do hibridoma AF4 perante produção de AcM anti-AFB₁ (Tabela 1), por outro lado, traduziu-se em células sensíveis a quaisquer variações no cultivo, i.e. lenta recuperação, sendo a suplementação do meio o fator fundamental para adaptação e expansão.

O hibridoma AF4 requereu um mês de adaptação para atingir expansão adequada e produção de AcM anti-AFB₁, sendo conservado posteriormente em N₂ líquido (-185° C), com agente crioprotetor SFB:DMSO (9:1). A criopreservação mantém a característica biológica do hibridoma, conservando a capacidade de produção de anticorpo monoclonal durante anos, garantindo eficiente recuperação (HARLOW & LANE, 1988b). A alta contagem de células viáveis ($5,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^7$ células/mL) em fase logarítmica (Figura 12) também tem sido essencial para congelamento adequado e maior recuperação pós-estocagem (HARLOW & LANE, 1988b). A concentração de hibridoma viável congelado foi de $8,95 \times 10^6$ e $9,80 \times 10^6$ células/criotubo (Figura 11, Exp.1). Embora o DMSO seja crioprotetor, a interação com a membrana pode causar toxidez e dano celular (WEWETZER & DILMAGHANI, 2001). O contato com DMSO a 4° C deve ser minimizado na fase de pré-congelamento, sendo este relevante na sobrevivência celular (WEWETZER & DILMAGHANI, 2001).

O hibridoma adaptou-se gradualmente no meio H-SFM suplementado com 2 mM de L-glutamina (adição seqüencial de 25, 50, 75 % e 100 % de meio H-SFM, Figura 11, Exp 1). A substituição de RPMI por H-SFM eliminou os problemas com o uso de SFB, i.e. alto custo, heterogeneidade entre lotes, alto teor protéico que interfere na purificação de AcM, e contaminação por prions, vírus e micoplasmas, veiculados por meio do soro (LIDDELL & CRYER, 1991; BRUCE *et al.*, 2002; LEGAZPI *et al.*, 2005; EVEN *et al.*, 2006). Chang *et al.* (1980) reportaram o primeiro uso bem sucedido de meio livre de soro para cultivo de hibridoma. Neste estudo, 5 linhagens de hibridoma foram cultivadas em meio livre de soro por mais de 3 meses, e continuaram secretando AcM ao nível alcançado na presença de SFB.

Stoll *et al.* (1996) adaptaram célula de hibridoma secretora de IgA em 2 meios livres de soro comercialmente disponíveis. Kreutz *et al.* (1997) adaptaram uma linhagem de hibridoma secretora de IgG em meio livre de soro em 3 etapas de substituição gradual de meio.

No decorrer de tempo ocorreu contaminação fúngica, sendo os frascos contaminados descartados (Figura 11, Exp.1), já que se mantinha um estoque de células a -185° C. Na existência de estoque, a melhor opção consiste em autoclavar os cultivos contaminados e reiniciá-lo com células estocadas (HARLOW & LANE, 1988b). Na falta de estoque, os métodos potenciais para recuperar as culturas contaminadas seriam uso de antimicrobiano, se a contaminação fosse detectada no início, e inoculação da linhagem em camundongo como única alternativa de recuperação para contaminação avançada (HARLOW & LANE, 1988b).

Um criotubo mantido a -185° C ($8,95 \times 10^6$ células) foi descongelado após 2 meses e a viabilidade (Figura 12) pós-congelamento avaliada (14,64%) (Tabela 2). As células, acondicionadas em frasco com 10 mL de meio (RPMI com 20 % SFB e 2 mM de L-glutamina) e incubadas por 24 horas (37° C, 5 % CO₂), apresentaram-se todas mortas (Figura 11, Exp. 2). Para testar se as condições de cultivo estavam inadequadas para reativação, descongelou-se outro criotubo ($9,80 \times 10^6$ células, 9,88 % de viabilidade pós-congelamento) (Tabela 2) e ressuspendeu-se em 4,5 mL de meio RPMI com 20 % SFB e 2 mM de L-glutamina, para transferir em microplaca de 24 orifícios sob mesmas condições de incubação. A redução no volume visou condicionar uma área menor capaz de permitir proximidade celular, estimulando a multiplicação. Nas tentativas seguintes, um criotubo de hibridoma descongelado foi ressuspendido em 4 mL de meio RPMI com 20 % SFB e teor de L-glutamina aumentado para 4 mM; em outro criotubo, aumentou-se o teor de SFB para 40 % e manteve-se L-glutamina em 4 mM, submetendo-se ao cultivo em microplaca. Em todos os ensaios não se constatou adaptação celular, i.e. morte celular após 24 horas de cultivo.

Rastreando os fatores envolvidos na reativação celular do Exp. 2, i.e. meio, fatores suplementares e condições utilizadas, constatou-se o uso de água destilada e não ultra-pura no preparo de meio. Todavia, o insucesso repetiu-se com o meio RPMI preparado com água ultra-pura (4 mL de RPMI com 40 % SFB e 4 mM de L-glutamina). Um criotubo ($8,95 \times 10^6$ células) também foi encaminhado ao Laboratório de Imunologia (CCB), cujo insucesso na reativação confirmou falha na qualidade de água desde o início do preparo de estoque celular (Figura 11, Exp. 3).

Em vista disso, prosseguiu-se a produção de AcM anti-AFB₁ a partir de estoque inicial de hibridoma mantido a -185° C no Laboratório de Imunologia-CCB, ou seja,

células recém-enviadas do Japão adaptadas à condição de nosso cultivo e estocadas (Figura 11, Exp. 4). O descongelamento e adaptação de células em meio RPMI (água ultra-pura) com 20 % SFB e 2 mM de L-glutamina foram realizados no Laboratório de Imunologia, seguido de encaminhamento ao Laboratório do DCTA, onde se prosseguiu o cultivo em RPMI, aumentando SFB para 30 % e L-glutamina para 4 mM, para garantir a adaptação. As células híbridas adaptaram-se gradualmente ao meio, permitindo redução de SFB para 20, 15 até 10 % de SFB, seguida de adaptação gradual ao meio H-SFM (25 a 100 %) com 2 mM de L-glutamina, para produção de AcM. Neste ponto realizou-se um teste de viabilidade, mantendo um criotubo ($6,44 \times 10^6$ células) a -185°C por 12 dias. As células apresentaram-se viáveis (39,75 %) (Tabela 2), mantendo esta característica após 24 horas de incubação a 37°C sob 5 % de CO_2 .

Estes dados apontaram que as dificuldades ocorridas no Exp. 1 a 3 foram devidas à utilização de água destilada no cultivo celular, ao invés de água ultra-pura. Salienta-se a necessidade de aporte constante de água ultra-pura para o cultivo de hibridoma, principalmente para a estocagem de células sob N_2 líquido, devido à injúria celular por congelamento. No contexto, pode-se comparar a viabilidade celular em nossa condição (40%), em relação à viabilidade do mesmo hibridoma em *Kagawa University* (80%).

Confirmada a viabilidade, um lote de cultivo (H-SFM, 2 mM L-glutamina) foi estocado em criotubos ($6,86 \times 10^6$ células, -185°C), antes de prosseguir com a produção de anticorpo (Figura 11, Exp. 5). No decorrer do experimento, frascos contaminados com bactéria foram descartados. Justifica-se o fato, já que meios para o cultivo celular, inclusive o meio H-SFM, não contêm antibiótico. Portanto adicionou-se 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina ao meio H-SFM, sendo estes antibióticos comuns no cultivo de células (HARLOW & LANE, 1988b).

O *scale-up* da produção de AcM IgG anti-AFB₁ foi conduzido em meio H-SFM suplementado (2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina), inoculado com $2,5$ a $5,0 \times 10^4$ células/mL, sob cultivo estático por 15 dias sem substituição de meio, até morte celular (Figura 13). O *Scale-up* resultou no total de 7700 mL do sobrenadante de cultivo contendo 632,63 mg de proteína (82,18 $\mu\text{g/mL}$). Embora o cultivo de hibridoma em meio sintético forneça baixa concentração de IgG (50 $\mu\text{g/mL}$) (HARLOW & LANE, 1988b), o uso de L-glutamina, aliado à técnica de cultivo até morte celular permitiram aumento na produção de proteína (82,18 $\mu\text{g/mL}$, Figura 11, Exp 5).

O anticorpo foi precipitado com sulfato de amônio (40 % de saturação), já que consiste de técnica de concentração e purificação parcial simples e de baixo custo (HARLOW & LANE, 1988c). Após diálise em água ultra-pura procedeu-se liofilização e ressuspendeu-se em volume menor (aproximadamente 5 a 7 mL, 27 mg/mL), para confeccionar a coluna de imunoafinidade anti-AFB₁. A atividade de AcM específico para AFB₁, obtida por *scale-up*, foi confirmada pelo teste de capacidade de retenção de AFB₁ (5,0 mL de solução 10 ng/mL - Sigma, > 99 % pureza) em coluna de imunoafinidade (CIA) confeccionada. O AcM reteve 25,27 ng de AFB₁, sendo este eluído com 15 mL de metanol.

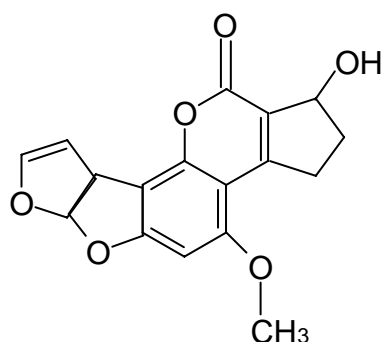
Em suma, o cultivo de hibridoma AF4 visando obter anti-AFB₁ mostrou-se laborioso, com etapas e detalhes críticos durante cultivo, mas com possibilidade de produção ilimitada de AcM específico destinado ao desenvolvimento de CIA, devendo-se prosseguir com otimização técnica. O fato abre perspectiva positiva para reduzir importação de *kits* imunológicos para análise de AFB₁, destinados ao controle de qualidade de alimentos.

Tabela 1 – Reatividade cruzada de anticorpo monoclonal produzido por hibridoma AF4 analisada por IC-ELISA (KAWAMURA *et al.*, 1988).

Aflatoxina	% reatividade cruzada
B ₁	100,0
B ₂	2,3
G ₁	3,4
G ₂	2,4
AFL I ^a	14,1
AFL II ^b	122,0
M ₁	4,5
Q ₁	10,8
P ₁	>1,3
B	>1,3

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

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



Aflatoxicol I

Figura 10 – Estrutura de aflatoxicol I, isômero natural [1S]-aflatoxicol.

Tabela 2 – Viabilidade celular de hibridoma AF4 em diferentes condições de meio de cultivo celular e tempo de manutenção a -185° C.

Condições		Contagem (cels viáveis/mL)		viabilidade celular (%)
Meio de cultivo	Tempo a -185° C (dias)	inicial	final	
RPMI (AD) + 10 % SFB	60	8,95 x 10 ⁶	1,31 x 10 ⁶	14,64
RPMI (AD) + 10 % SFB	62	9,8 x 10 ⁶	9,68 x 10 ⁵	9,88
RPMI (AD) + 10 % SFB	67	9,8 x 10 ⁶	9,0 x 10 ⁵	9,18
RPMI (AD) + 10 % SFB	73	9,8 x 10 ⁶	1,68 x 10 ⁶	17,14
RPMI (AD) + 10 % SFB	82	9,8 x 10 ⁶	9,7 x 10 ⁵	9,89
RPMI (AD) + 10 % SFB	89	8,95 x 10 ⁶	n.d.	n.d.
RPMI (AP) + 10 % SFB	100	n.d	n.d.	≈ 40-50
H-SFM (AP) + 2 mM Gln	12	6,44 x 10 ⁶	2,56 x 10 ⁶	39,75

AD – água destilada

AP – água ultra-pura

n.d. – não determinado

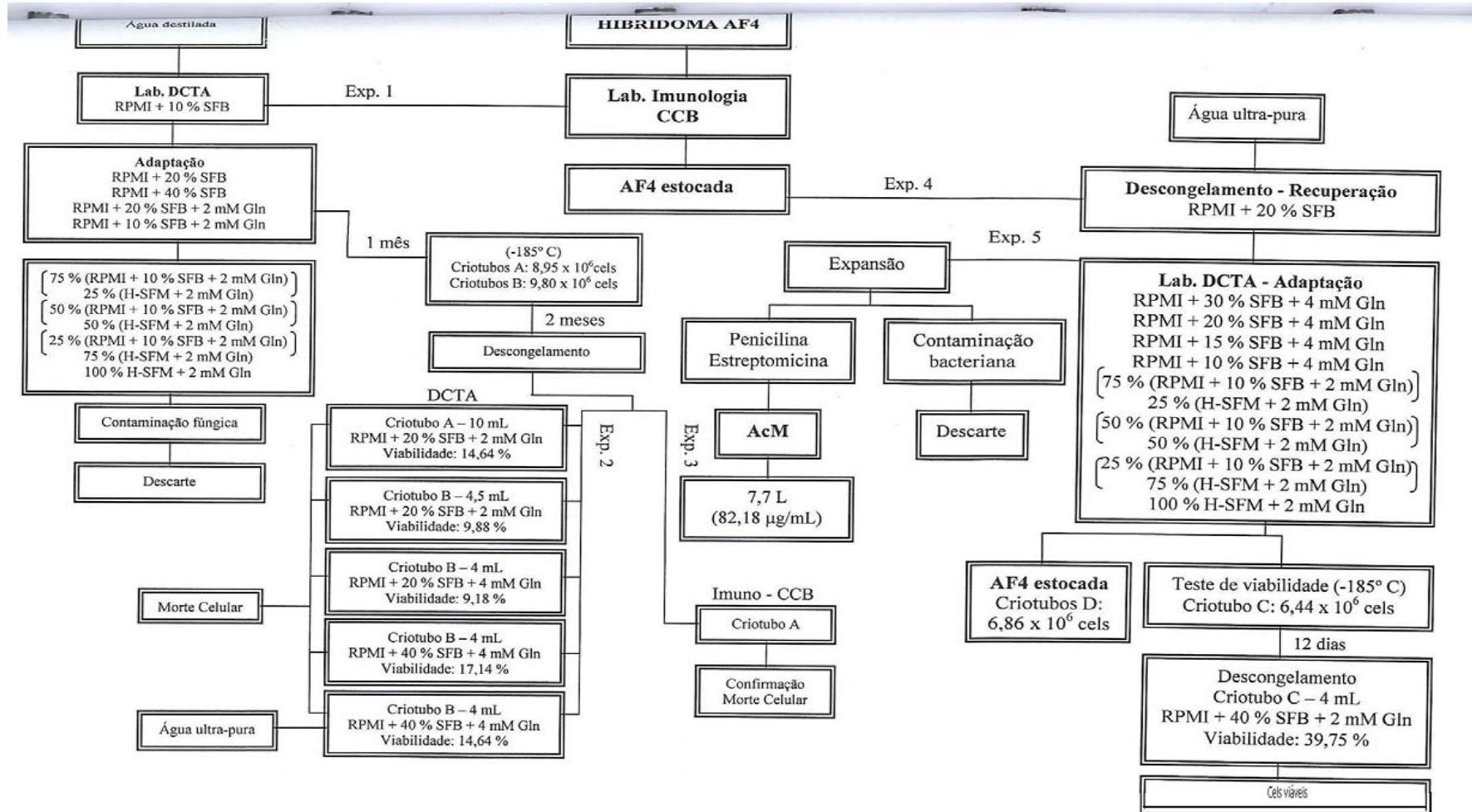


Figura 11 – Recepção, reativação, adaptação, manutenção e cultivo de hibridoma AF4, com produção de anticorpo monoclonal (AcM) anti-AFB₁. Experimento 1, 2, 3, 4 e 5 (Exp. 1, Exp. 2, Exp. 3, Exp. 4, Exp. 5 respectivamente). L-g *lin*ina (Gln). Meio RPMI 1640 (RPMI) e Hybridoma SFM (H-SFM). Soro fetal bovino (SFB). Hibridoma AF4 (AF4). Lab. DCTA (Laboratório do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos). Imuno-CCB (Laboratório de Imunologia do Centro de Ciências Biológicas).

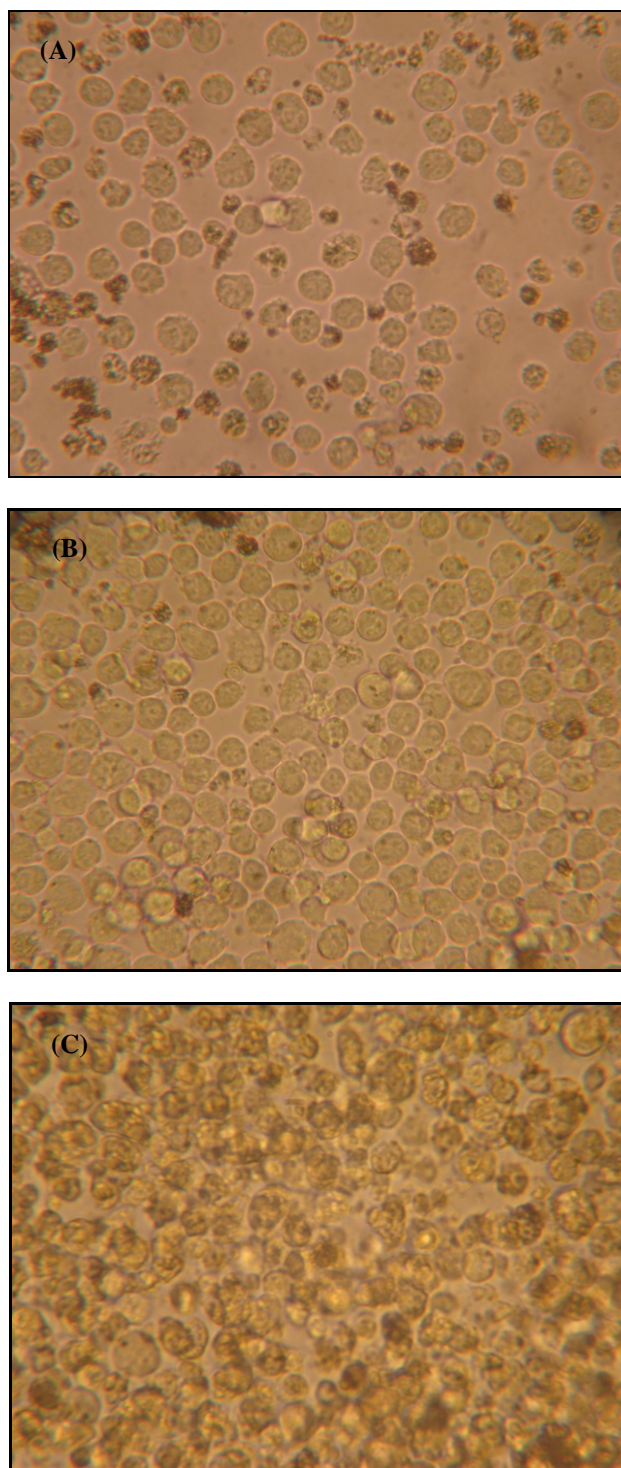


Figura 12 – Vista microscópica de células de hibridoma AF4 em meio Hybridoma-SFM (aumento de 10 vezes). (A) Contagem inicial ($2,5$ a $5,0 \times 10^4$ células/mL); (B) Saturação celular, após 3-4 dias de cultivo (5×10^5 a 1×10^6 células/mL); (C) Morte celular, após 15 dias de cultivo sem substituição do meio.

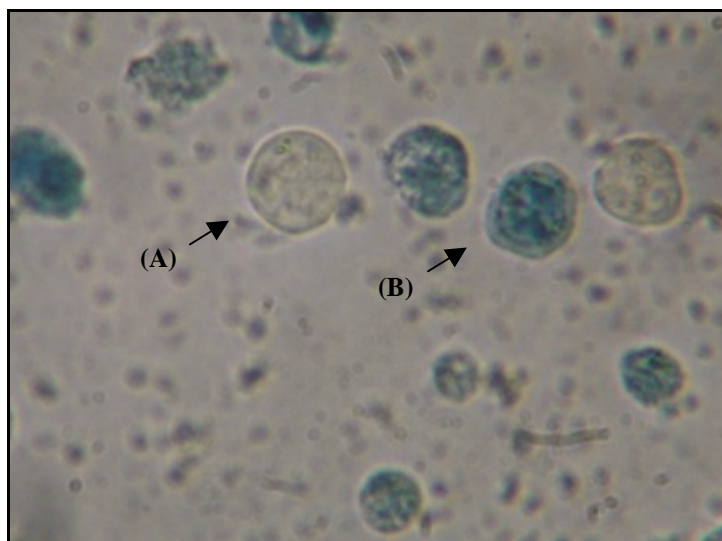


Figura 13 – Viabilidade de hibridoma AF4 por microscopia utilizando corante vital Azul de Trypan. (A) Célula viável caracteriza-se por exclusão do corante (refringência), citoplasma homogêneo e membrana íntegra com aspecto liso; (B) Célula morta cora-se com Azul de Trypan.

CAPÍTULO II

ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFLATOXINA B₁: SCALE-UP, PURIFICAÇÃO-PARCIAL E DESENVOLVIMENTO DA COLUNA DE IMUNOAFINIDADE

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação parcial de anticorpo monoclonal IgG anti-AFB₁

A purificação parcial de anticorpo monoclonal (AcM) anti-AFB₁ foi realizada pela precipitação de proteínas com sulfato de amônio (40 % de saturação) (item 4.2.6.1).

Desenvolvimento da coluna de imunoafinidade (CIA) para detecção de AFB₁ empregando AcM anti-AFB₁

A coluna de imunoafinidade para análise de AFB₁ foi desenvolvida com suporte ativado de imunoafinidade (*Activated Immunoaffinity Supports*) Affi-Gel 10 (Bio-Rad) e anticorpo monoclonal produzido e parcialmente purificado em nosso laboratório, seguindo as instruções do fabricante de Affi-Gel 10 (item 4.3.1).

Manutenção de CIA Affi-Gel 10

A coluna foi mantida a 4° C em PBS (tampão fosfato de sódio) contendo 0,02 % de azida sódica (NaN₃) (item 4.3.2).

Avaliação da eficiência de acoplamento de anticorpos à CIA Affi-Gel 10

A eficiência de acoplamento de anticorpos monoclonais ao suporte Affi-Gel 10 foi determinada por quantificação de anticorpos eluídos na etapa de lavagem da coluna por absorção a 280 nm após o período de imobilização entre ligante e gel (suporte) (item 4.3.3).

Determinação da capacidade de retenção de AFB₁ em CIA Affi-Gel 10

A capacidade de CIA desenvolvida em reter AFB₁ foi determinada por comparação entre concentração de AFB₁ adicionada e eluída da coluna (item 4.3.4).

Teste de recuperação de AFB₁ em CIA Affi-Gel 10

A coluna de imunoafinidade confeccionada com o suporte Affi-Gel 10 foi avaliada quanto à eficiência na limpeza e determinação de AFB₁ em milho (item 4.4).

Cinquenta gramas de milho (48 mesh) foram artificialmente contaminados com solução padrão de AFB₁ (Sigma) (10 ng/mL em metanol) para as concentrações de 5, 15 e 30 ng AFB₁/g alimento. As amostras foram mantidas em repouso por 24 horas a 25° C, submetidas à extração e limpeza em CIA Affi-Gel 10 para posterior quantificação por espectrofluorimetria (itens 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4).

Regeneração de CIA Affi-Gel 10

Após o uso, a CIA Affi-Gel 10 foi regenerada conforme Nakajima *et al.* (1990) e avaliada quanto à reutilização (item 4.4.5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

***Scale-up* e purificação parcial de anticorpo monoclonal**

O *scale-up* da produção de AcM IgG anti-AFB₁ foi conduzido com hibridoma AF4 em meio *Hybridoma*-SFM suplementado (2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina), inoculado com 2,5 a 5,0 x 10⁴ células/mL, sob cultivo estático por 15 dias, sem substituição de meio, i.e. até morte celular. O processo resultou no total de 7700 mL de sobrenadante com 632,63 mg de proteína (82,18 µg/mL) (Tabela 3). O fato mostrou que embora o cultivo de hibridoma em meio sintético forneça baixa concentração de IgG, em torno de 50,00 µg/mL (HARLOW & LANE, 1988b), o uso de L-glutamina aliado ao cultivo até morte celular justificou o aumento de teor protéico para 82,18 µg/mL.

O AcM foi precipitado com sulfato de amônio (40 % de saturação), já que constitui técnica de concentração e purificação parcial simples e de baixo custo (HARLOW & LANE, 1988c). A Figura 14 esquematiza o fluxograma dos processos de purificação testados. O AcM do sobrenadante de cultivo 1 e 2 (Figura 14) foi precipitado com sulfato de amônio, dialisado em PBS e, após leitura a 280 nm, acondicionado em tubos e armazenado a -20° C. O

congelamento de anticorpo monoclonal dialisado em PBS após precipitação com sulfato de amônio (45 % de saturação) até o uso também tem sido seguido por Pfeiffer *et al.* (1987). A leitura a 280 nm constitui método rápido de quantificação protéica em solução sem destruição do analito, sendo que a absorção ocorre devido à presença de tirosina e triptofano (NELSON & COX, 2000; HARLOW & LANE, 1988e). Após 4 meses, as soluções foram descongeladas, dialisadas em água ultra-pura para eliminar sais e lidas a 280 nm. Houve aumento no teor protéico no fator de 1,6 a 1,8 (Tabela 3), indicando que o processo de congelamento e descongelamento causou desnaturação e agregação de anticorpo, com possível perda de atividade por efeito estérico no sítio de ligação Ag-Ac, ou pela formação de material insolúvel. Este pode ser removido por filtração ou centrifugação (HARLOW & LANE, 1988c), mas ambos os fatos provavelmente contribuíram para expor maior número de resíduos de tirosina e triptofano, aumentando a leitura de absorvância. A solução foi congelada (-20° C) e liofilizada (-50° C) para aumentar a concentração de Ac destinado ao desenvolvimento de CIA (25 a 30 mg/mL de gel), e armazenada a -20° C (Ac utilizado na confecção de CIA 7, 8 e 9). Os sobrenadantes de cultivo 3 e 4 (Figura 14) submetidos ao mesmo processo de purificação parcial dos sobrenadantes 1 e 2 (até a primeira diálise em PBS) foram quantificados a 280 nm, aliqüotados e armazenados a -20° C.

Tendo em vista a desnaturação de AcM, eliminou-se a etapa de congelamento, submetendo o sobrenadante de cultivo diretamente às diálises (sobrenadante 5 e 6). O sobrenadante de cultivo 5 (Figura 14) foi precipitado com sulfato de amônio (40 % de saturação), dialisado em PBS e em água ultra-pura, obtendo 101,97 mg de proteína (280 nm). Após aliqüotar o AcM semi-puro, procedeu-se o congelamento (-20° C), liofilização (-50° C) e armazenamento a -20° C, até a confecção de CIA 2 a 6.

Com a finalidade de reduzir o custo de *scale-up*, no experimento seguinte inseriu-se a etapa de concentração por ultrafiltração para reduzir a quantidade de sulfato de amônio adicionado (KONDO *et al.*, 2000). A ultrafiltração de sobrenadante 6 (2,9 L) (Figura 14) reduziu o volume para 440 mL e aumentou a concentração de proteína no fator de 5,79, para prosseguir com etapa de purificação com sulfato de amônio. Após diálise em PBS e água ultra-pura, os anticorpos foram quantificados a 280 nm, congelados (-20° C), liofilizados (-50° C) e armazenados a -20° C até a confecção de CIA 1.

A Tabela 4 compara os processos de purificação de AcM dos sobrenadantes 5 e 6. Os resultados indicaram que a ultrafiltração (sobrenadante 6) reduziu a recuperação de Acs para 74,20 % no final da purificação, em comparação ao método sem-ultrafiltração

(sobrenadante 5, 80,40 % de recuperação). A vantagem consistiu na economia de sulfato de amônio, reduzindo o reagente de 704,7 para 106,92 g (redução de 84,83 %).

A etapa sobre purificação de anticorpo atingiu sucesso parcial, devido à persistência de problemas relacionados ao congelamento e descongelamento, desnaturando AcM produzido, devendo-se adotar cuidados para melhorar a eficiência de AcM, sem prejudicar a purificação. A desvantagem da precipitação com sulfato de amônio consistiu na precipitação de outras proteínas de alta massa molecular, além de AcM alvo (HARLOW & LANE, 1988c). Uma solução seria inclusão da etapa de precipitação empregando menor concentração de sulfato de amônio (< 40 % saturação), para remover agregados protéicos indesejáveis, antes de prosseguir com a coleta de AcM desejado. Considerando a sensibilidade deste AcM ao congelamento e descongelamento, o AcM em uso deveria ser armazenado a 4° C, evitando-se ao máximo mudanças bruscas (ambiente climatizado, transporte, constância na condição de manutenção). Harlow e Lane (1988c) garantiram a estabilidade de 6 meses para AcM mantido sem congelamento, assim como recomendaram armazenamento de AcM purificado em alta concentração (≥ 1 mg/mL) e pH neutro, concentrado sob ultrafiltração.

Desenvolvimento da coluna de imunoafinidade anti-AFB₁ empregando Affi-Gel 10

O AcM purificado e liofilizado foi utilizado para o desenvolvimento de 9 colunas de imunoafinidade, denominadas de CIA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. A Figura 15 esquematiza o fluxograma referente a ensaios experimentais envolvendo CIA desenvolvida com AcM anti-AFB₁ (CIA Affi-Gel 10) e respectivos testes da capacidade de retenção e recuperação de AFB₁ (CIA 1 a 9).

A CIA 1 (Figura 16), desenvolvida com AcM liofilizado obtido de sobrenadante 6 (139,74 mg/5,0 mL), utilizou tampão bicarbonato de sódio como tampão de ligação e 3 mL de suporte gel ativado (Affi-Gel 10). A quantidade de AcM acoplado ao gel não foi determinada. O gel acoplado com IgG foi acondicionado em seringa de 5 mL e mantido a 4° C com 0,02 % de azida sódica. Para testar a capacidade de retenção de AFB₁, introduziu-se 5 mL de AFB₁ (10 ng/mL, Sigma) para saturar os sítios de ligação micotoxina-AcM anti-AFB₁ e a AFB₁ foi eluída em 3 frações sequenciais de 1 mL de metanol (quantificação por espectrofluorimetria, 350-440 nm de excitação e emissão, respectivamente). A Tabela 5 apresenta a AFB₁ retida em CIA; todas as frações eluídas com metanol continham AFB₁, sendo que a fração 3 reteve maior quantidade (30,59 ng). Fixando o

total de AFB₁ introduzida na CIA 1 em 50 ng, a coluna desenvolvida apresentou capacidade de retenção de 42,20 ng (soma de AFB₁ das 3 frações eluídas). A espectrofluorimetria de solução pós-coluna de AFB₁ em metanol água, i.e. solução anterior à eluição com metanol, detectou 8,05 ng de AFB₁, indicando saturação da coluna. Assim sendo, esta coluna seria indicada para uso em concentração de AFB₁ < 42 ng, devendo eluir a toxina com 3,0 mL de metanol. A coluna Aflatest-P (VICAM) emprega 1 mL de metanol para eluir até 150 ng/g de aflatoxina, indicando diferença qualitativa e quantitativa no Ac acoplado à coluna.

Considerando a capacidade de retenção de AFB₁ (42,20 ng) e a quantidade de gel utilizado em ensaios no Japão (0,2 a 0,3 mL de gel) (KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*) confeccionou-se as CIAs subsequentes, reduzindo a quantidade de gel acoplado com AcM para 0,5 mL (Figura 17).

As CIAs 2, 3, 4, 5 e 6 foram desenvolvidas misturando AcM liofilizado obtido de sobrenadante 6 (47,77 mg) e 5 (101,97 mg), utilizando tampão de ligação bicarbonato de sódio (5,5 mL) e o gel acoplado (3 mL) mantido a 4° C com 0,02 % de azida sódica. A solução de AcM foi quantificada a 280 nm quanto ao teor de proteína (IgG) pré e pós-acoplamento com o suporte Affi-Gel 10 (Tabela 6), para determinar a quantidade de AcM acoplado. A quantidade inicial de proteína (pré-liofilização, 149,74 mg) diferenciou da quantidade pós-liofilização ressuspensa em tampão de ligação (125,03 mg), na fase anterior ao acoplamento com Affi-Gel 10. A diferença pode ser devido à perda de material durante a liofilização. Por outro lado, a diálise com água ultra-pura removeu os sais e diminuiu danos à molécula protéica, impedindo desnaturação, se comparado ao efeito observado na Tabela 3. Salienta-se também que este concentrado protéico sofreu apenas uma etapa de congelamento, evitando provável dano seqüencial, como ocorrido com o processo conduzido com sobrenadante 1 e 2 (Figura 14). Após acoplamento, o AcM não acoplado foi separado do gel (centrifugação) e a quantidade de proteína no sobrenadante determinada a 280 nm (Tabela 6). O gel foi lavado com PBS para remover o AcM não-ligado, sendo o teor de proteína na solução de lavagem também quantificado a 280 nm (Tabela 6). Os resultados mostraram-se incoerentes, já que a quantidade de proteína na solução pré-acoplamento (pós-liofilização) apresentou-se inferior (125,03 mg) ao valor pós-acoplamento somado à quantidade na solução de lavagem (189,53 mg), indicando interferência de Affi-Gel residual na absorção a 280 nm. Esta interferência do gel não foi eliminada mesmo com a centrifugação (2400 x g, 5 min), com redução mínima no teor de proteína pós-acoplamento e solução de lavagem (145,29 mg), impedindo o cálculo da quantidade de AcM acoplado ao suporte Affi-Gel (Tabela 6).

A CIA 2 foi confeccionada em seringa de 1 mL, introduzindo 0,5 mL de suporte Affi-Gel 10 acoplado com AcM, e analisou-se a capacidade de retenção de AFB₁. Cinco mL de solução de AFB₁ (10 ng/mL, Sigma, > 99 % pureza) foram introduzidos na CIA 2 e a toxina eluída seqüencialmente com 5 mL e 10 mL de metanol (KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*), e quantificada por espectrofluorimetria testando diferentes comprimentos de excitação e emissão (Figura 18, Tabela 7). A Tabela 7 mostra a variação da capacidade de retenção de AFB₁ (18,87 a 25,32 ng), dependente do comprimento de onda. Esta variação ocorreu devido à diferença no espectro da fluorescência de AFB₁ com a mudança do comprimento de onda de excitação e emissão (Figura 18). A escolha de 360 nm para excitação e 420 nm para emissão baseou-se na maior leitura obtida durante análise de mesma solução, aliada a sensibilidade e estabilidade entre leituras consecutivas (Figura 18). Tarín *et al.* (2004) também utilizaram 360 nm para excitação e 420 nm para emissão para análise de aflatoxina em detector de fluorescência acoplado a CLAE. Assim, a capacidade de retenção de AFB₁ pela CIA 2 foi definida em 25,32 ng.

Um teste em paralelo foi realizado com a curva padrão de AFB₁ para analisar a estabilidade da fluorescência de AFB₁ durante 57 min, utilizando 360 e 420 nm como comprimento de excitação e emissão, respectivamente (Figura 19). O gráfico mostra que não houve variação considerável na fluorescência detectada no decorrer de 57 min, mantendo o coeficiente de determinação (R^2) quase inalterado (0,9980 a 0,9997). Isto significa que os dados estão bem ajustados à equação da reta.

As CIAs 3, 4, 5 e 6 foram confeccionadas em seringa de 1 mL (0,5 mL de suporte Affi-Gel acoplado com AcM) para realizar teste de recuperação de AFB₁ em milho em 3 níveis de contaminação artificial: 5, 15 e 30 ng/g. A AFB₁ foi eluída da CIA com 2 frações de 10 mL de metanol e quantificada por espectrofluorimetria e CCD. A Tabela 8 mostra que a CIA desenvolvida não foi eficiente na limpeza de amostra, obtendo-se elevada fluorescência com AFB₁ recuperada atingindo 1146,20 %, indicando interferência direta de matriz alimentar. A corrida por CCD também mostrou inúmeras bandas interferentes, impedindo a análise de AFB₁. Os compostos interferentes podem ser oriundos de extração prolongada (30 min), ausentes numa extração rápida (1 min) (VICAM, Manual de Instruções de Aflatest).

As CIAs 7, 8 e 9 originaram de sobrenadante 1 (74,05 mg de AcM liofilizado) adicionado de 3 mL de suporte Affi-Gel 10, mudando tampão de ligação para HEPES pH 8,0 (7,5 mL, Sigma Chemical Co., H-3375, St. Louis, MO). O gel acoplado foi mantido a 4° C até o preparo de CIA 7, 8 e 9 (0,5 mL de gel em seringa de 1 mL), sendo as

etapas de acoplamento monitoradas quanto ao teor protéico por Método de Lowry (LOWRY, 1951). A Tabela 6 mostra incoerência nos dados obtidos, já que a quantidade de proteína determinada (661,88 mg) foi muito superior à quantidade existente (74,05 mg), descartando o Método de Lowry para esta finalidade. Uma nova tentativa de quantificar os AcMs acoplados foi realizada acidificando o pH da solução de Acs, já que a presença dos resíduos de N-hidroxisuccinamida (componente do suporte Affi-Gel 10) interfere na detecção de proteína, devido à absorção a 280 nm em pH neutro ou básico (BIO-RAD, 2000). Mesmo assim, os resultados obtidos não foram satisfatórios (Tabela 6), pois se eliminou a interferência de N-hidroxisuccinamida na leitura a 280 nm, mas não os Acs interferentes (presentes no SFB) e desnaturados, que aumentaram a leitura protéica. Uma alternativa para obter a quantidade de AcM acoplado ao gel seria utilizar a metodologia de Bradford para determinação de proteínas (BRADFORD, 1976).

A CIA 7 foi preparada para teste de recuperação de AFB₁ em milho contaminado artificialmente com 30 ng/g de padrão de AFB₁. A aflatoxina foi eluída com 2 frações de 7,5 mL de metanol e quantificada por espectrofluorimetria (360-420 nm). A Tabela 9 indicou que a CIA desenvolvida não foi eficiente na limpeza de interferentes naturais da matriz alimentar, i.e. capturou componentes fluorescentes, aumentando a fluorescência e, conseqüentemente, a recuperação de AFB₁ para mais de 100 %. A extração de AFB₁ com tempo reduzido (1 min) não diminuiu a interferência de compostos fluorescentes presentes na amostra. Isto pode ser decorrente de ligações inespecíficas de componentes de matriz alimentar com sítios ativos da CIA não acoplados com AcM. O fabricante de suporte Affi-Gel 10 recomenda bloquear os ésteres ativos restantes com glicina-etil-éster 1M, pH 8,0, para minimizar a interferência, procedendo ao capeamento de CIA (BIO-RAD, 2000).

As CIAs 8 e 9 foram utilizadas para teste de capeamento de CIA desenvolvida, empregando glicina-etil-éster 1M, pH 8,0 (BIO-RAD, 2000) e leite desnatado 5% (p/v) em PBS, recomendado como solução bloqueadora em ensaios imunoenzimáticos (HARLOW & LANE, 1988d). A reação de capeamento com glicina-etil-éster foi conduzida por 1 hora a 25° C, enquanto a reação com leite desnatado foi incubada por 4 horas a 25° C. Em seguida, as CIAs foram lavadas com água ultra-pura para retirar o reagente não-ligante à CIA e imediatamente acondicionadas em PBS. O teste de recuperação de AFB₁ foi realizado com milho contaminado artificialmente com 5 ng/g, e a toxina eluída com 2 frações de 7,5 mL de metanol e quantificada por espectrofluorimetria (360-420 nm). Durante a eluição de aflatoxina da CIA, percebeu-se que parte do reagente não ligado à CIA, não foi retirado completamente com a lavagem de água ultra-pura, pois apareceu como fase contaminante na

primeira fração eluída, i.e. fase esbranquiçada acima do metanol. Isto ocorreu devido ao não acondicionamento da coluna com o solvente de eluição (metanol) previamente ao uso, como recomendado pelo manual do fabricante. Na análise espectrofluorimétrica da amostra, a fluorescência detectada sofreu interferência tanto dos resíduos de reagente quanto de compostos presentes no milho, sugerindo alta porcentagem de recuperação (658,60 a 1012,40 %) (Tabela 10). O fato indicou que a reação de capeamento não foi eficaz para permitir limpeza completa de amostra e detecção de AFB₁. Outro fator importante a ser considerado é o emprego de AcM anti-AFB₁ bastante debilitado pelo processo de purificação e concentração envolvendo etapas de congelamento e descongelamento.

Em suma, embora a CIA Affi-Gel 10 confeccionada tenha apresentado ineficiência na limpeza de amostra e recuperação de AFB₁, o AcM anti-AFB₁ produzido mostrou-se ativo no teste de capacidade de retenção desta micotoxina, devendo-se prosseguir com estudo inserindo novas condições de capeamento de coluna e ensaios de padronização. Assim, a disponibilidade de AcM específico, limpeza de extrato alimentar em única etapa cromatográfica, uso reduzido de solventes tóxicos e possibilidade de reutilização, justificam o desenvolvimento de CIA, visando minimizar o custo referente à aquisição e aplicação no controle de qualidade.

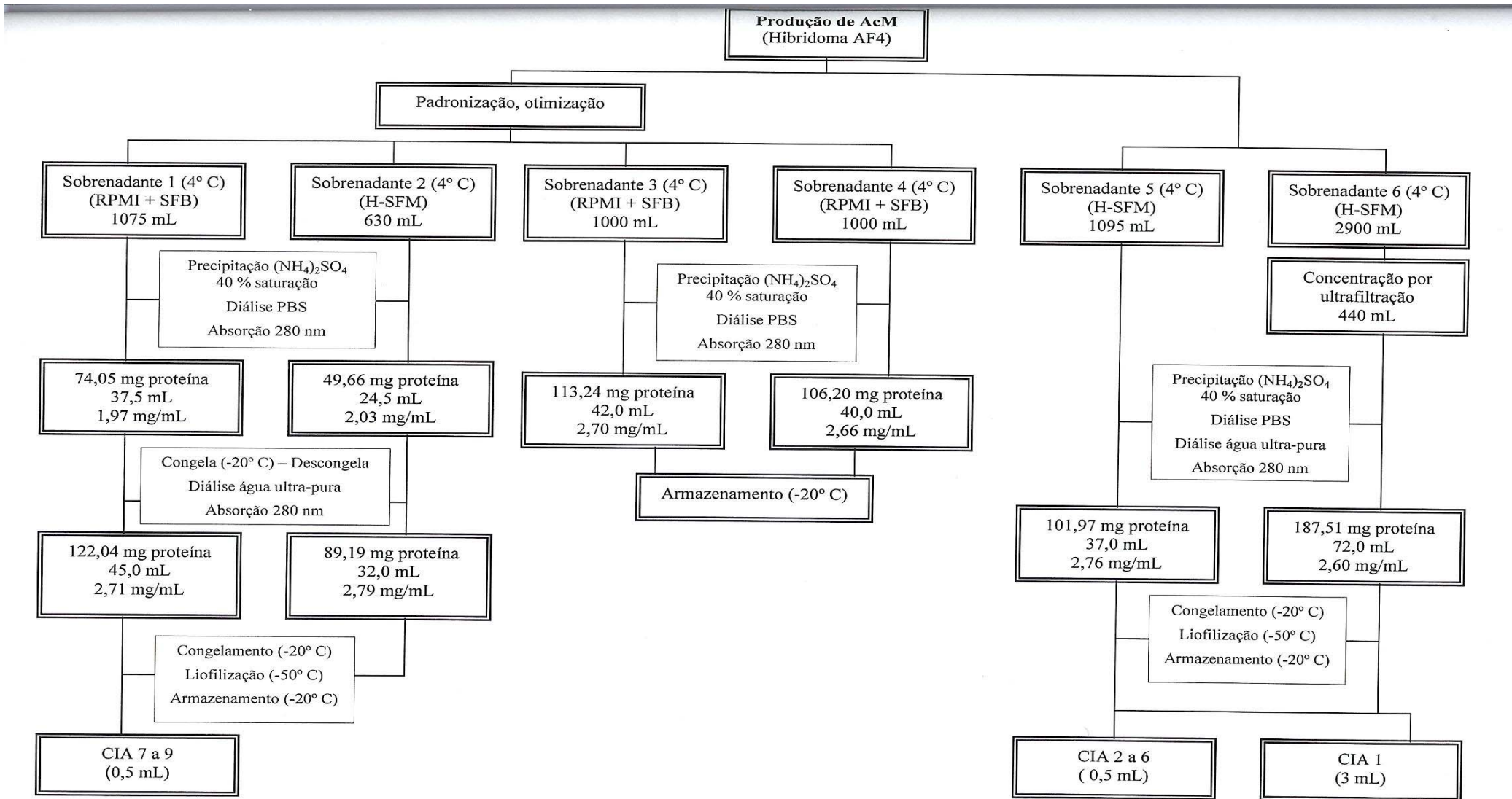


Figura 14 – Purificação parcial de anticorpo monoclonal (AcM) anti-AFB₁ por precipitação com (NH₄)₂SO₄ (40 % saturação) visando desenvolvimento de coluna de imunoafinidade (CIA). Meio RPMI 1640 (RPMI) e *Hybridoma*-SFM (H-SFM). Tampão fosfato de sódio (PBS). Soro fetal bovino (SFB)

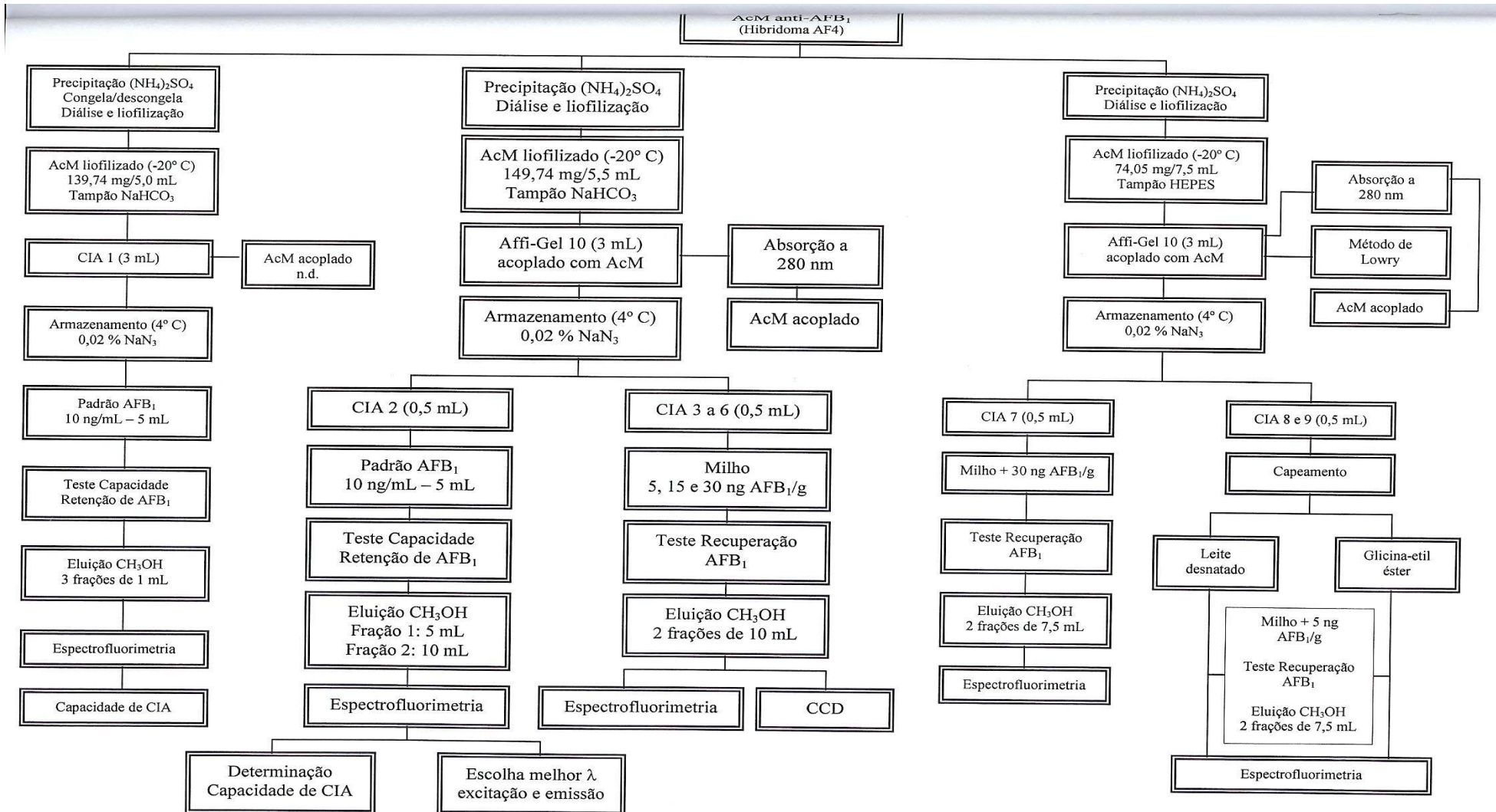


Figura 15 – Desenvolvimento de coluna de imunoafinidade (CIA) utilizando anticorpo monoclonal (AcM) anti-AFB₁ e suporte Affi-Gel 10, e testes de capacidade de retenção e recuperação de AFB₁ em CIA desenvolvida.

Tabela 3 – Proteína (IgG) produzida por hibridoma AF4 em diferentes meios de cultivo, quantificada por absorção a 280 nm.

Sobrenadante	Meio cultivo	Pós-diálise em PBS			Pós-diálise em água ultra-pura			Fator (b/a)	Proteína considerada (mg)
		Volume (mL)	[] Proteína (mg/mL)	Proteína ^a (mg)	Volume (mL)	[] Proteína (mg/mL)	Proteína ^b (mg)		
1	RPMI + SFB	37,5	1,97	74,05	15,0	2,71	122,04	1,65	74,05
2	H-SFM	24,5	2,03	49,66	16,0	2,79	89,19	1,80	49,66
3	RPMI + SFB	42,0	2,70	113,24	n.d.	n.d.	n.d.	---	113,24
4	RPMI + SFB	40,0	2,66	106,20	n.d.	n.d.	n.d.	---	106,20
5	H-SFM	n.d.	n.d.	n.d.	37,0	2,76	101,98	---	101,98
6 (UF)	H-SFM	n.d.	n.d.	n.d.	72,0	2,60	187,50	---	187,50
Total									632,63

UF – Ultrafiltração

RPMI – meio RPMI 1640

H-SFM – meio *Hybridoma*-SFM

SFB – soro fetal bovino

PBS – tampão fosfato de sódio

n.d. – não determinado

Tabela 4 – Comparação entre os processos de semi-purificação de anticorpo monoclonal dos sobrenadantes 5 e 6.

Tratamento	Sobrenadante 5					Sobrenadante 6				
	Volume (mL)	Proteína [] mg/mL	Proteína Total (mg)	Recuperação (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	Volume (mL)	Proteína [] mg/mL	Proteína Total (mg)	Recuperação (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)
Pré-Ultrafiltração	1095	0,116	127,02	100,00	266,09	2900	0,087	252,30	100,00	704,70
Pós-Ultrafiltração	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	---	440	0,504	221,76	87,90	106,92
Pós-(NH₄)₂SO₄	37	2,76	102,12	80,40	---	72	2,600	187,20	74,20	---

n.d. – não determinado

Tabela 5 – Teste preliminar de capacidade de retenção de AFB₁ pela coluna de imunoafinidade desenvolvida com anticorpo monoclonal anti-AFB₁ e suporte Affi-Gel 10 (CIA Affi-Gel 10), com quantificação de AFB₁ por espectrofluorimetria (350-440 nm).

Fração*	AFB ₁ (ng/mL)	AFB ₁ (ng)
1	1,21	2,43
2	4,59	9,18
3	15,29	30,59
RP	4,02	8,05
Total		50,25

*Fração de metanol contendo AFB₁ eluída da CIA Affi-Gel 10: 1, 2 e 3 (1mL)

RP – Quantidade restante de padrão introduzida em CIA

Tabela 6 – Determinação de proteína (IgG) acoplada à coluna de imunoafinidade desenvolvida com anticorpo monoclonal anti-AFB₁ e suporte Affi-Gel 10 (CIA Affi-Gel 10).

Método	Proteína (mg)				
	pré-liofilização (mg)	pós-liofilização (mg)	pós-acoplamento (mg)	solução lavagem (mg)	acoplada (mg)
A 280 nm	149,74	125,03	139,23	50,30	n.d.
A 280 nm (2400 x g)	149,74	125,03	98,94	46,35	n.d.
Método de Lowry	74,05	661,88	n.d.	n.d.	n.d.
A 280 nm (acidificado)	74,05	417,23	262,13	n.d.	n.d.

A 280 – Absorção a 280 nm

A 280 (2400 x g) – Absorção a 280 nm após centrifugação a 2400 x g

A 280 (acidificado) – Absorção a 280 nm após acidificação do pH para 5,5

n.d. – não determinado

Tabela 7 – Capacidade de retenção de AFB₁ pela coluna de imunoafinidade desenvolvida com anticorpo monoclonal anti-AFB₁ e suporte Affi-Gel 10 (CIA Affi-Gel 10), considerando diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão na análise espectrofluorimétrica.

CIA Affi-Gel 10	AFB ₁ (ng)					
	350-440 (nm)	350-450 (nm)	360-420 (nm)	365-425 (nm)	365-435 (nm)	365-440 (nm)
F1	15,94	15,31	18,98	17,27	14,54	14,53
F2	5,13	5,48	6,34	6,35	4,48	4,34
Capacidade	21,07	20,79	25,32	23,62	19,02	18,87

F1 – primeira fração de metanol eluída da CIA Affi-Gel 10

F2 – segunda fração de metanol eluída da CIA Affi-Gel 10

Tabela 8 – Teste preliminar de recuperação de AFB₁ em milho utilizando 3 níveis de contaminação artificial (5, 15 e 30 ng/g), com extração em tempo prolongado (30 min), limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade confeccionada com suporte Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB₁, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB ₁ adicionada (ng/g)	Fração*	AFB ₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%) (soma frações)
5	1	44,26	1146,2
5	2	13,05	
15	1	31,15	291,67
15	2	12,6	
30	1	27,14	136,23
30	2	13,73	

*Fração de metanol contendo AFB₁ eluída da coluna: 10 mL cada

Tabela 9 – Teste de recuperação de AFB₁ em milho contaminado artificialmente com 30 ng/g, com extração em tempo reduzido (1 min), limpeza de amostra em CIA confeccionada com suporte Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB₁, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB₁ adicionada (ng/g)	Fração*	AFB₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%) (soma frações)
30	1	41,06	188,67
30	2	15,54	

*Fração de metanol contendo AFB₁ eluída da coluna: 7,5 mL cada

Tabela 10 – Teste de recuperação de AFB₁ em milho contaminado artificialmente com 5 ng/g, com limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade confeccionada com suporte Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB₁, capeada com glicina-etil-éster ou leite desnatado, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB₁ adicionada (ng/g)	Fração^a	Agente de capeamento^b	AFB₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%) (soma frações)
5	1	glicina-etil-éster	30,68	1012,4
5	2		19,94	
5	1	leite desnatado	26,17	658,6
5	2		6,76	

^aFração de metanol contendo AFB₁ eluída da coluna: 7,5 mL cada

^bReagente utilizado no capeamento de CIA Affi-Gel 10: glicina-etil-éster 1,0 M, pH 8,0; leite desnatado 5 %



Figura 16 – CIA 1 anti-AFB₁ confeccionada com 3 mL de Affi-Gel 10.



Figura 17 – CIA anti-AFB₁ confeccionada com 0,5 mL de Affi-Gel 10.

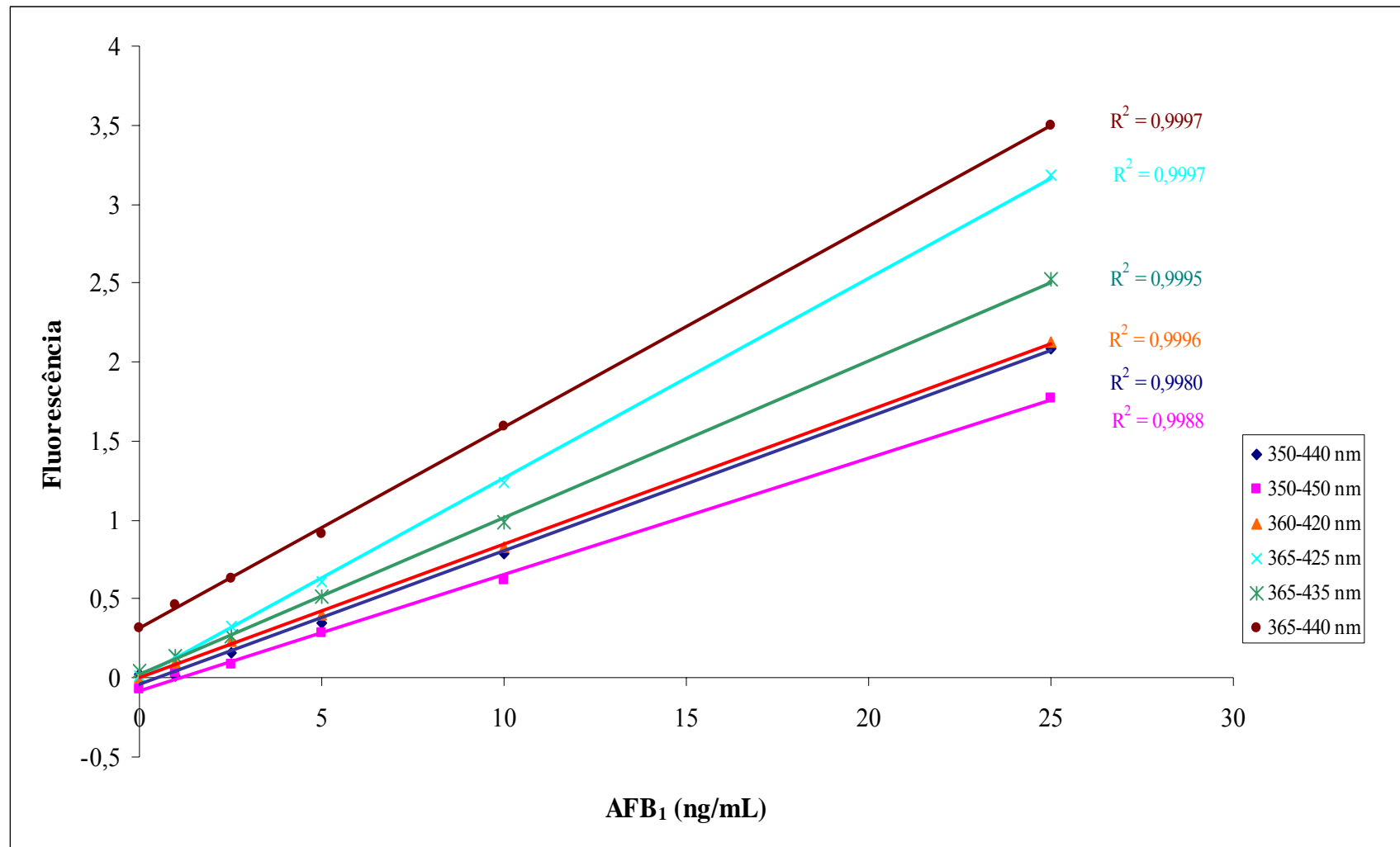


Figura 18 – Comportamento da fluorescência de AFB₁ com a variação de comprimento de onda de excitação e emissão.

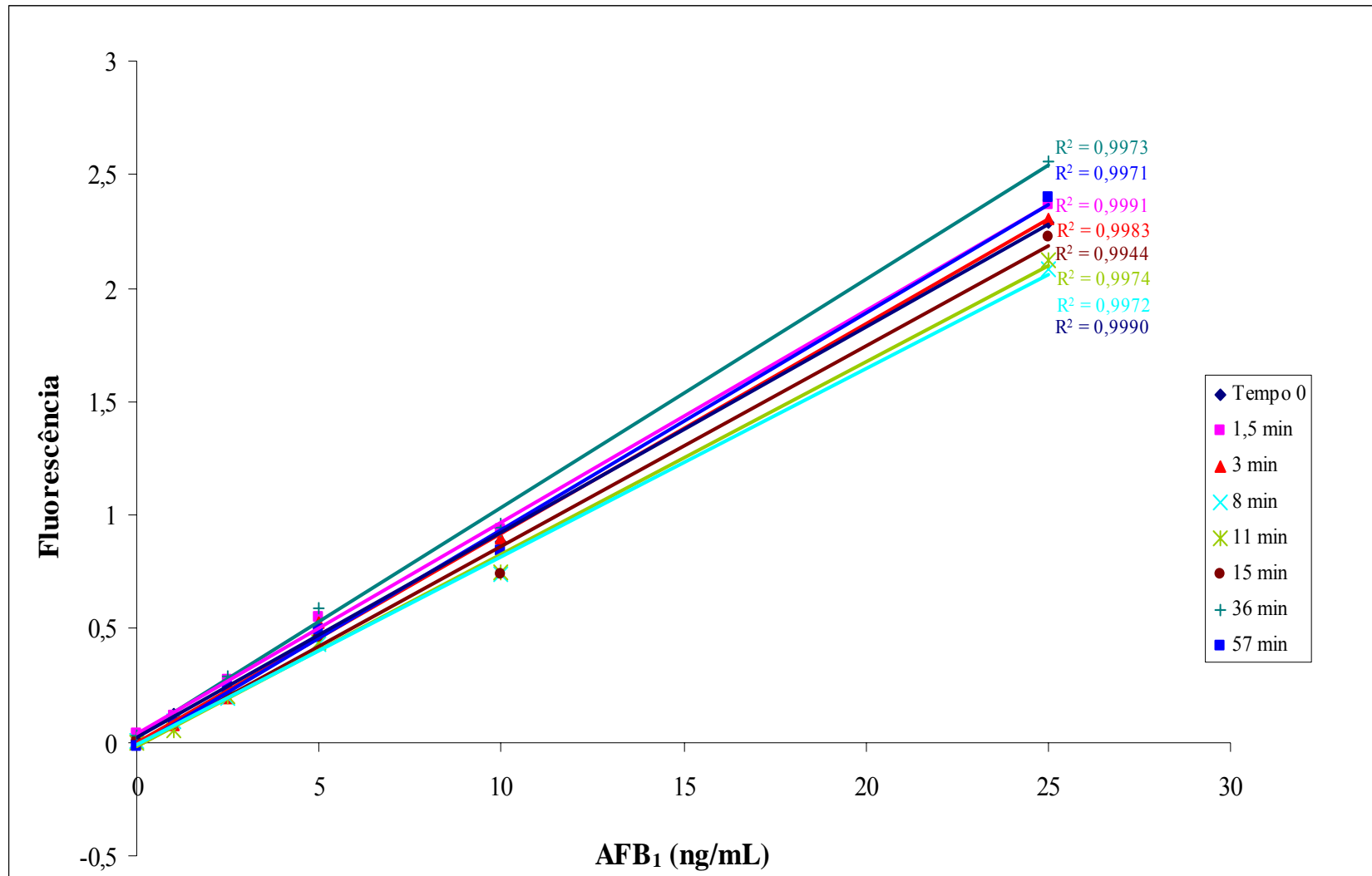


Figura 19 – Variação da fluorescência de AFB₁ em função do tempo, utilizando 360 e 420 nm como comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente.

CAPÍTULO III

COLUNA DE IMUNOAFINIDADE PARA ESPECTROFLUORIMETRIA: DETECÇÃO DE AFB₁ EM MILHO PELA CIA COMERCIAL VERSUS CIA AFFI-GEL 10-AcM ANTI-AFB₁ DESENVOLVIDA

MATERIAL E MÉTODOS

Teste de recuperação de AFB₁ em CIA Affi-Gel 10 e CIA Aflatest-P

A coluna de imunoafinidade (CIA) confeccionada com o suporte Affi-Gel 10 (CIA Affi-Gel 10) foi avaliada quanto à eficiência na limpeza e determinação de AFB₁ em milho, em comparação à CIA comercial Aflatest-P (VICAM) (item 4.4).

Cinquenta gramas de milho (48 mesh) foram artificialmente contaminados com solução padrão de AFB₁ (Sigma) (10 ng/mL em metanol) para as concentrações de 5, 15 e 30 ng AFB₁/g alimento. As amostras foram mantidas em repouso por 24 horas a 25° C, extraídas e submetidas à limpeza em CIA Affi-Gel 10 e CIA Aflatest-P para posterior quantificação por espectrofluorimetria (itens 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4).

Regeneração de CIA Affi-Gel 10

Após o uso, a CIA Affi-Gel 10 foi regenerada conforme Nakajima *et al.* (1990) e avaliada quanto à reutilização (item 4.4.5).

Comparação entre espectrofluorimetria e CCD para análise de AFB₁

A contaminação de milho procedeu-se conforme item 4.4.1. As amostras foram mantidas em repouso por 24 horas a 25° C, submetidas à extração e limpeza em CIA comercial Aflatest-P para posterior quantificação por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrofluorimetria (itens 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4 e 4.5.5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desempenho de CIA Affi-Gel 10 (Figura 20) foi comparado à CIA comercial Aflatest-P (Figura 21) quanto à eficiência no processo de limpeza e recuperação de AFB₁ em milho. A escolha de matriz alimentar milho baseou-se na persistente ocorrência de aflatoxina em milho em regiões do Brasil, como Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraíba (BALDISSERA *et al.*, 1992; SOARES & FURLANI, 1992; POZZI *et al.*, 1995; CARDOSO & BRAGA, 1997; BADIALE-FURLONG *et al.*, 1998; MENEGAZZO, 1998; ONO *et al.*, 1998b; PICH *et al.*, 1998; CORREA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2000 apud SALAY & MERCADANTE, 2002, p.89).

A Figura 22 esquematiza o teste preliminar de recuperação de AFB₁ em milho utilizando 3 níveis de contaminação artificial (5, 15 e 30 ng/g), com limpeza de amostra em CIA Aflatest-P e CIA Affi-Gel 10, e análise por CCD e espectrofluorimetria. A pureza do padrão de AFB₁, i.e. banda única com fluorescência azul, foi confirmada em CCD. O extrato bruto de milho, seco e ressuspendido em clorofórmio para análise em CCD formou grumos insolúveis, provavelmente devido à alteração na polaridade do solvente ao longo de 30 min, resultando em compostos interferentes adicionais menos polares. A partição deste extrato bruto com hexano (3 vezes) removeu parcialmente os interferentes lipídicos (JAIMEZ *et al.*, 2000). Em seguida, adicionou-se a água e procedeu-se a partição com clorofórmio. O processo permitiu obter resíduo capaz de ressuspende em clorofórmio e proceder CCD, embora não eliminasse os interferentes, dificultando a análise de aflatoxina.

O mesmo extrato bruto foi submetido à limpeza em CIA e quantificado por espectrofluorimetria (360-420 nm, definido CAPÍTULO II). A AFB₁ foi eluída de CIA Aflatest-P com 1 mL de metanol, enquanto que se empregou 2 frações de 10 mL para CIA Affi-Gel 10. A Tabela 11 mostra uma baixa recuperação de AFB₁ (29,60 a 62,03 %, Aflatest-P), enquanto a Tabela 12 apresenta uma superestimação de resultados, ultrapassando 100 % de recuperação (136,23 a 1146,20 %, Affi-Gel 10), indicando problemas na extração de aflatoxina; soma-se ainda a ineficácia de CIA Affi-Gel 10 na eliminação de interferentes. A extração por 30 min aumentou compostos interferentes, afetando a interação de antígeno-anticorpo na CIA por efeito estérico.

Na etapa seguinte reduziu-se o tempo de extração para 1 min e procedeu-se teste de recuperação com 5 e 30 ng/g de AFB₁ em CIA Aflatest-P e 30 ng/g em CIA Affi-Gel 10 (Figura 23). Após limpeza em CIA, a AFB₁ foi eluída com 1 mL de metanol (Aflatest-P) e

2 frações de 7,5 mL (Affi-Gel 10). A Tabela 13 mostra o aumento na recuperação para 72,40 e 79,77 % para CIA Aflatest-P, perante contaminação de 5 e 30 ng/g, respectivamente. Yazdanpanah *et al.* (2001) obtiveram recuperação de AFB₁ de 60,9, 80,3 e 74,4 % respectivamente para 0,25, 2 e 40 ng/g em milho empregando Aflatest (VICAM) e análise por CLAE (365-435 nm). Os autores atingiram esta recuperação em milho contaminado com 40 ng/g de AFB₁ após modificar a metodologia do fabricante (anteriormente com 65-68 % de recuperação). O mesmo extrato apresentou performance similar para Aflatest (VICAM) e AFLAPREP (Rhone-Diagnostics Technologies Ltd., UK) com 69,2-74,4 % de recuperação. A recuperação de 69,00 % de AFB₁ foi atingida em milho contaminado (0 a 50 ng/g), analisado por CLAE com reação fotoquímica pós-coluna (360-440 nm) (VICAM, Manual de Instruções de Aflatest). Aflatest (VICAM) seguida de fluorimetria (350-450 nm) atingiu a recuperação de 79,27 a 122,92 % de aflatoxina total em milho (DIÁRIO OFICIAL, 2000).

Segundo o fabricante, a coluna Aflatest-P deve ser usada uma única vez, não se recomendando a reutilização. Mesmo assim, uma avaliação perante reutilização foi realizada com milho contaminado com 5 e 30 ng/g AFB₁, sendo a coluna para uso-2 e uso-3 aleatoriamente escolhida entre as colunas já utilizadas, simulando uma análise de rotina (Tabela 14). No segundo uso, a recuperação de AFB₁ decaiu consideravelmente, passando de 72,40 para 34,15 % na contaminação de 5 ng/g e de 79,77 para 50,24 % na contaminação de 30 ng/g, indicando que não convém reutilizar a CIA Aflatest-P (Tabela 14). Para confirmação, uma CIA Aflatest-P usada e uma nova foram testadas para limpeza de amostra contaminada com 30 ng/g. Todavia, obteve-se resultado contraditório, já que a recuperação na coluna usada (82,88 %) apresentou-se maior que na coluna nova (37,54 %), diferindo ainda dos resultados anteriores (Tabela 14). A performance do terceiro uso da CIA Aflatest-P também se apresentou baixa (36,08 % de recuperação). Estes dados sugeriram variabilidade na performance de CIAs comerciais de um mesmo lote, i.e. além de diferença na capacidade de recuperação na reutilização, até colunas novas podem inferir erros de análise, devendo-se analisar reprodutibilidade de CIA em duplicata.

A Figura 24 mostra o teste da estabilidade de fluorescência, i.e. variação na leitura de uma mesma amostra (AFB₁ recuperada) conduzida durante 57 min. A recuperação de AFB₁ calculada na contaminação de 5 ng/g variou de 3,40 a 3,88 ng/g, enquanto que na de 30 ng/g variou de 20,36 a 24,19 ng/g. Não houve uma variação linear na leitura, indicando flutuação associada à instabilidade das condições de análise (ex, rede elétrica), e não devido à perda de amostra por evaporação (200 µL).

A Tabela 15 mostra o teste de recuperação de AFB₁ em CIA Affi-Gel 10 (milho com 30 ng/g AFB₁). O resultado (188,67 % de recuperação) indicou ineficácia de CIA Affi-Gel 10 na eliminação de compostos interferentes fluorescentes, devendo-se proceder ao capeamento para bloquear ésteres ativos do gel, não acoplados com AcM, para impedir a ligação inespecífica do gel com interferentes de matriz alimentar (BIO-RAD, 2000; FUJII, 2007).

A Tabela 16 mostra resultado preliminar de dois testes de capeamento de CIA utilizando glicina-etil-éster 1,0 M, pH 8,0 (BIO-RAD, 2000) e 5 % de leite desnatado em PBS (p/v), recomendado como solução bloqueadora em ensaios imunoenzimáticos (HARLOW & LANE, 1988d). A reação de capeamento com glicina-etil-éster foi conduzida por 1 hora a 25° C, enquanto a reação com leite desnatado por 4 horas a 25° C. Em seguida, as CIAs foram lavadas com água ultra-pura para retirar o reagente não-ligante à CIA e imediatamente acondicionadas em PBS.

O teste de recuperação de AFB₁ foi realizado com milho contaminado artificialmente com 5 ng/g e a CIA eluída com 2 frações de 7,5 mL de metanol e aflatoxina quantificada por espectrofluorimetria (360-420 nm). Após a eluição de CIA, o eluato dividiu-se em duas fases, sendo a primeira esbranquiçada (contaminante) e a segunda transparente (metanol), sugerindo que parte do reagente não ligado à CIA não foi completamente removido com água ultra-pura. Isto ocorreu devido ao não acondicionamento da coluna com metanol após a fase de capeamento, i.e. entre lavagem com água e manutenção em PBS, como recomendado pelo manual do fabricante (BIO-RAD, 2000).

Consequentemente, a fluorescência detectada consistiu da soma de interferentes oriundos de reagente residual e componentes do milho, obtendo falsa recuperação entre 658,60 a 1012,40 % (Tabela 16). O fato indicou que cuidados adicionais seriam necessários durante a fase de capeamento, para permitir limpeza completa de amostra. Salienta-se também, que o AcM anti-AFB₁ usado no preparo de CIA (CIA 7, 8 e 9) tinha sido bastante debilitado pelo processo de purificação e concentração envolvendo etapas de congelamento e descongelamento.

Os resultados mostraram a importância dos cuidados, desde a fase de extração na análise de aflatoxina até a formação de técnicos com base analítico-científica perante interpretação de resultados, para emitir laudos confiáveis. A CIA comercial também requer cuidados especiais de conservação e armazenamento para que seja eficaz na detecção de aflatoxina, evitando resultados falso-positivos. A complementação com análise microbiológica é essencial para confirmar presença de fungos produtores de aflatoxina na

amostra analisada, assim como o histórico da amostra referente à procedência, condições de armazenamento e processamento envolvendo tratamento térmico.

Em suma, embora a CIA Affi-Gel 10 confeccionada para análise de AFB₁ ainda seja ineficiente em comparação à CIA comercial Aflatest-P, o AcM anti-AFB₁ produzido apresentou-se específico contra AFB₁, devendo-se prosseguir com estudo inserindo novas condições de capeamento de coluna e ensaios de padronização. A disponibilidade de AcM específico, limpeza de extrato alimentar em única etapa cromatográfica, uso reduzido de solventes tóxicos e possibilidade de reutilização, justificam o desenvolvimento de CIA, visando minimizar o custo de aquisição e aplicação no controle de qualidade.



Figura 20 – CIA anti-AFB₁ confeccionada com 0,5 mL de Affi-Gel 10.



Figura 21 – CIA comercial Aflatest-P (VICAM).

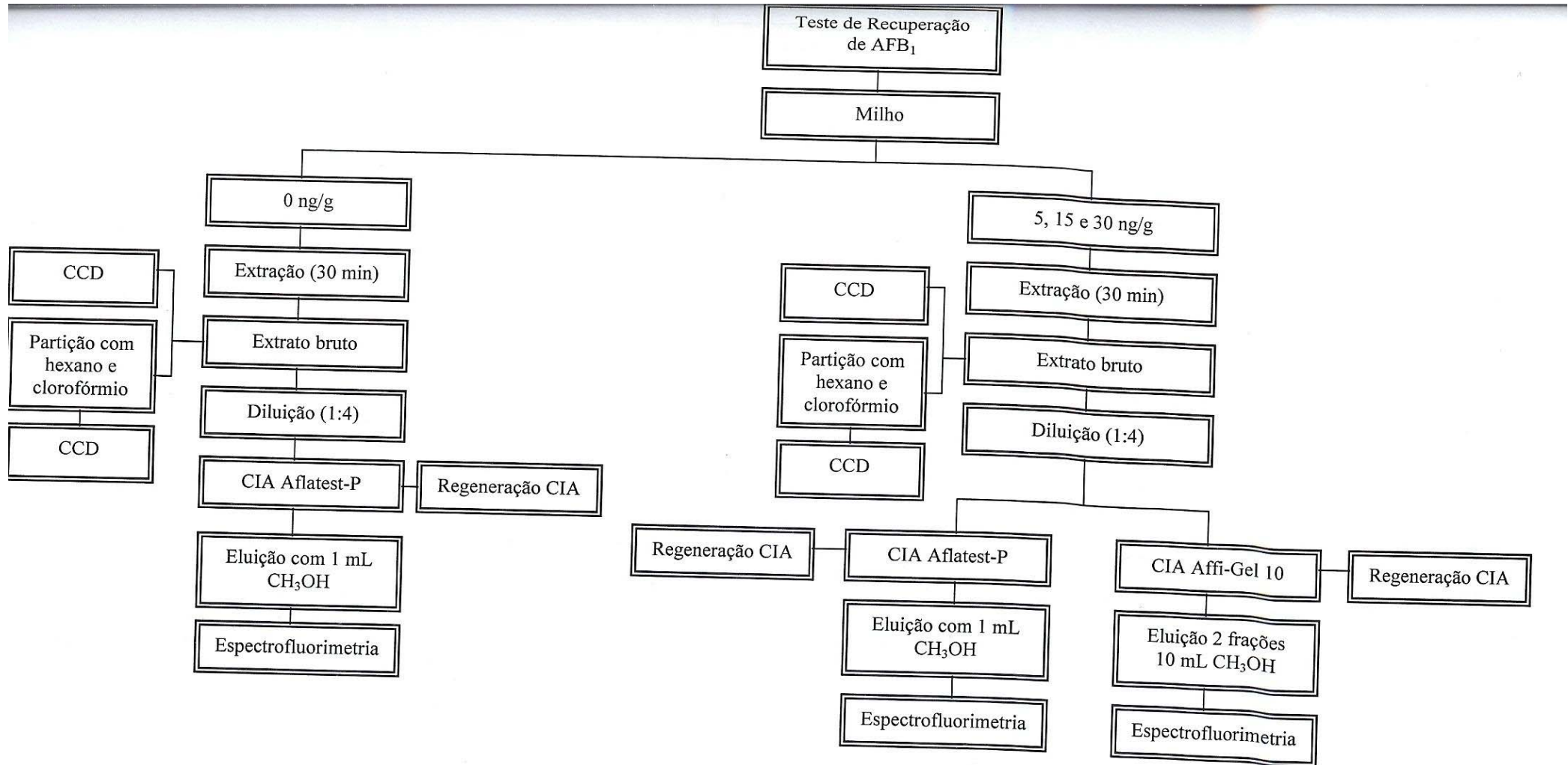


Figura 22 – Teste preliminar de recuperação de AFB₁ em milho utilizando 3 níveis de contaminação artificial (5, 15 e 30 ng/g) e extração em tempo prolongado (30 min), com limpeza prévia de amostra em CIA Aflatest-P e CIA confeccionada com Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB₁, e quantificação por espectrofluorimetria e cromatografia em camada delgada (CCD)

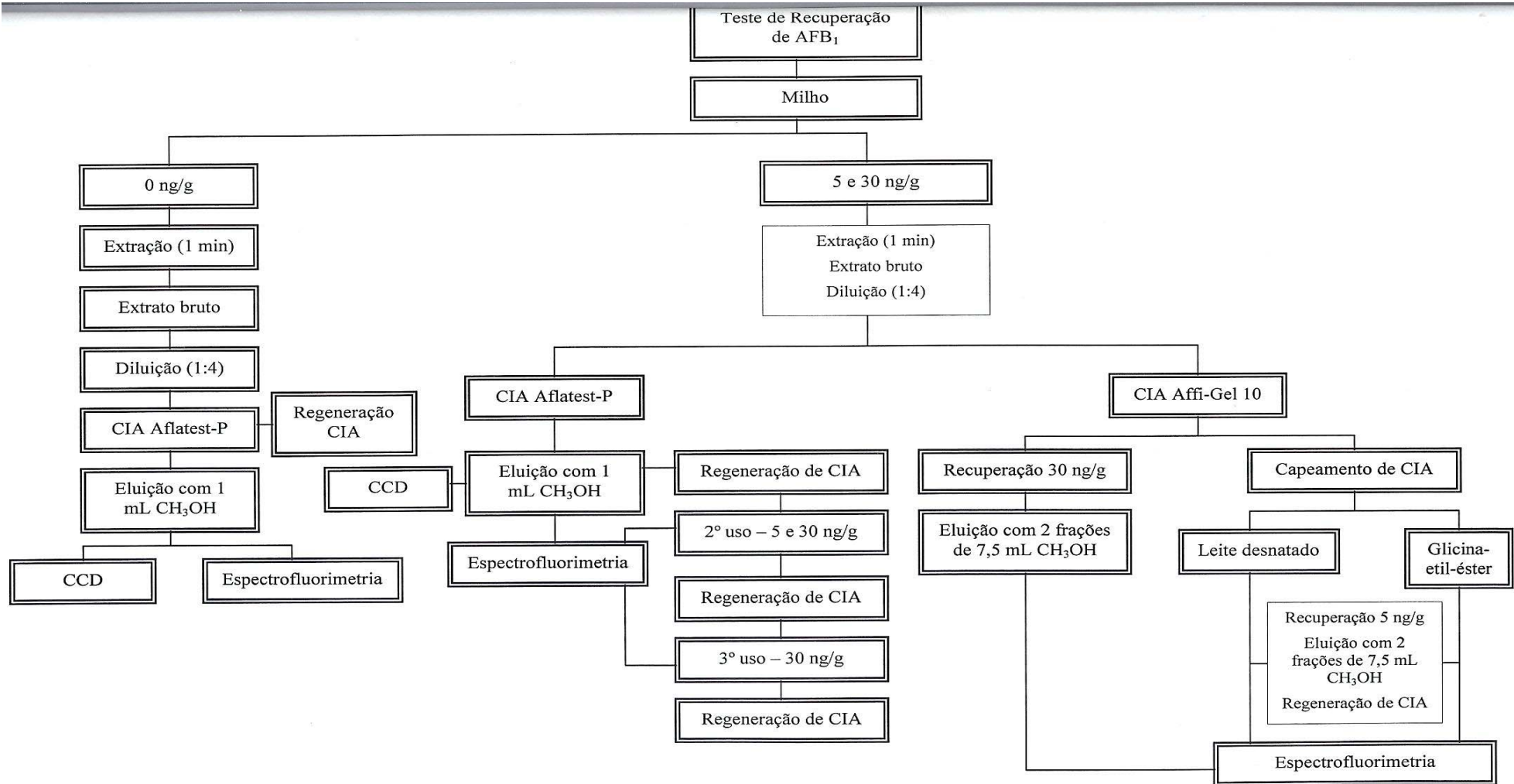


Figura 23 – Teste de recuperação de AFB₁ em milho utilizando 2 níveis de contaminação artificial (5 e 30 ng/g) e extração em tempo reduzido (1 min), com limpeza prévia de amostra em CIA Aflatest-P e CIA confeccionada com Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB₁, e quantificação por espectrofluorimetria e cromatografia em camada delgada (CCD)

Tabela 11 – Teste preliminar de recuperação de AFB₁ em milho utilizando 3 níveis de contaminação artificial (5, 15 e 30 ng/g), com extração em tempo prolongado (30 min), limpeza de amostra em CIA comercial Aflatest-P, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB₁ adicionada (ng/g)	AFB₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%)
0	0,19	---
5	1,48	29,6
15	5,41	36,07
30	18,61	62,03

Tabela 12 – Teste preliminar de recuperação de AFB₁ em milho utilizando 3 níveis de contaminação artificial (5, 15 e 30 ng/g), com extração em tempo prolongado (30 min), limpeza de amostra em CIA confeccionada com suporte Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB₁, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB₁ adicionada (ng/g)	Fração*	AFB₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%) (soma frações)
5	1	44,26	1146,2
5	2	13,05	
15	1	31,15	291,67
15	2	12,6	
30	1	27,14	136,23
30	2	13,73	

*Fração de metanol contendo AFB₁ eluída da coluna: 10 mL cada

Tabela 13 – Teste de recuperação de AFB₁ em milho utilizando 2 níveis de contaminação artificial (5 e 30 ng/g), com extração em tempo reduzido (1 min), limpeza de amostra em CIA comercial Aflatest-P e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB₁ adicionada (ng/g)	AFB₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%)
0	0,37	---
5	3,62	72,40
30	23,93	79,77

Tabela 14 – Teste de recuperação de AFB₁ em milho com 2 níveis de contaminação artificial (5 e 30 ng/g), reutilizando CIA comercial Aflatest-P para limpeza de amostra, com quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

Uso*	AFB ₁ adicionada (ng/g)	AFB ₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%)
1	5	3,62	72,40
	30	23,93	79,77
	30	11,26	37,54
2	5	1,71	34,15
	30	15,07	50,24
	30	24,86	82,88
3	30	10,82	36,08

*Uso de CIA Aflatest-P: 1 (primeiro uso), 2 (segundo uso) e 3 (terceiro uso)

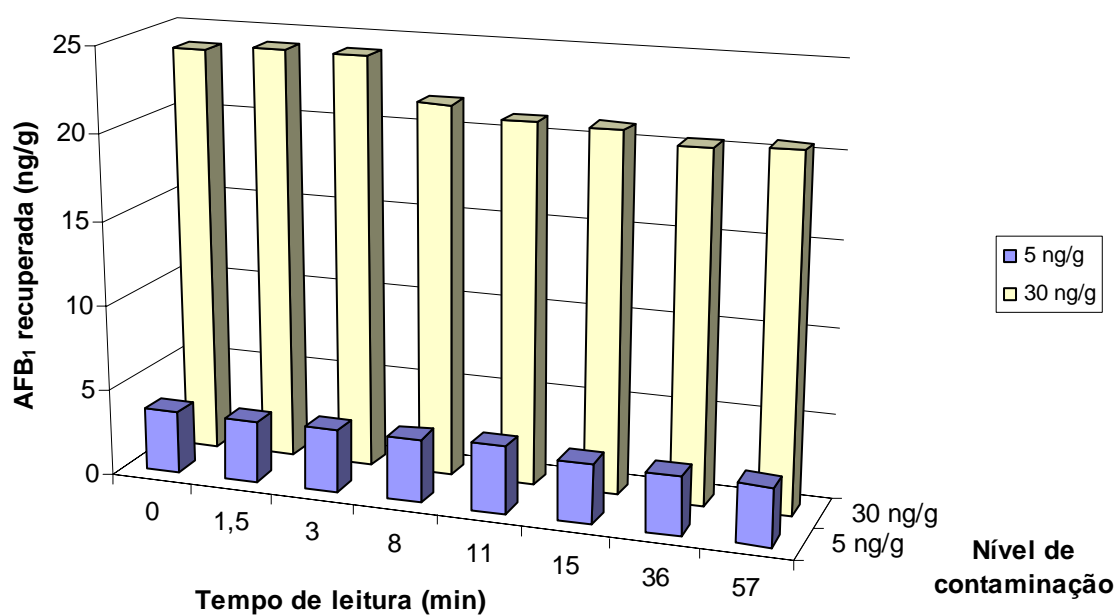


Figura 24 – Variação da taxa de recuperação de AFB₁ de milho contaminado artificialmente em 2 níveis (5 e 30 ng/g) utilizando CIA comercial Aflatest-P para limpeza de amostra, calculada a partir da intensidade de fluorescência detectada no decorrer de 57 min, em 360 nm de excitação e 420 nm de emissão.

Tabela 15 – Teste de recuperação de AFB₁ em milho contaminado artificialmente com 30 ng/g, com extração em tempo reduzido (1 min), limpeza de amostra em CIA confeccionada com suporte Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB₁, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB₁ adicionada (ng/g)	Fração*	AFB₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%) (soma frações)
30	1	41,06	188,67
30	2	15,54	

*Fração de metanol contendo AFB₁ eluída da coluna: 7,5 mL cada

Tabela 16 – Teste de recuperação de AFB₁ em milho contaminado artificialmente com 5 ng/g, com limpeza de amostra em CIA confeccionada com suporte Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB₁, capeada com glicina-etil-éster ou leite desnatado, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB₁ adicionada (ng/g)	Fração^a	Agente de capeamento^b	AFB₁ recuperada (ng/g)	Recuperação (%) (soma frações)
5	1	glicina-etil-éster	30,68	1012,4
5	2		19,94	
5	1	leite desnatado	26,17	658,6
5	2		6,76	

^aFração de metanol contendo AFB₁ eluída da coluna: 7,5 mL cada

^bReagente utilizado no capeamento de CIA Affi-Gel 10: glicina-etil-éster 1,0 M, pH 8,0; leite desnatado 5 %

6 CONCLUSÃO

O *scale-up* com êxito na produção de AcM IgG anti-AFB₁ requer cuidados especiais, sendo aconselhável proceder ultrafiltração para concentração do anticorpo e subsequente manutenção a 4° C para conservar a integridade e atividade biológica. O AcM concentrado, utilizado no desenvolvimento da coluna de imunoafinidade para detecção de AFB₁, ainda apresentou baixo desempenho na limpeza de interferentes. Todavia, a especificidade de AcM foi comprovada pelo teste de capacidade de retenção de AFB₁, devendo-se prosseguir com estudo inserindo novas condições de capeamento da coluna e ensaios de padronização. Outrossim, mesmo a análise de AFB₁ empregando coluna comercial deve ser conduzida em duplicata para garantir resultados confiáveis. A disponibilidade de AcM específico, limpeza de extrato alimentar em etapa cromatográfica única, uso reduzido de solventes tóxicos e possibilidade de reutilização justificam o desenvolvimento de CIA nacional, contribuindo para minimizar o custo referente à aquisição e aplicação em laboratório de controle de qualidade.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, H.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W.T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop protection**, v.25, p.1-9, 2006.
2. AGHAMOHAMMADI, M.; HASHEMI, J.; KRAM, G.A.; ALIZADEH, N. Enhanced synchronous spectrofluorimetric determination of aflatoxin B₁ in pistachio samples using multivariate analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.582, p.288-294, 2007.
3. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Brasil, 2002a. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. **Resolução nº25**. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15717&word=>> Acesso em 17 set. 2006.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Brasil, 2002b. Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho, constante do anexo desta Resolução. **Resolução RDC nº274**. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1653&word=>> Acesso em 17 set. 2006.
5. AGUETE, E. C.; GAGO-MARTÍNEZ, A.; LEÃO, J. M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, J. A.; MENARD, 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.
6. AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TANAKA, T.; TOYODA, M. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using multifunctional column clean-up. **Journal of Chromatography A**, v.932, p.153-157, 2001.
7. AMMIDA, N. H. S.; MICHELI, L.; PALLESCHI, G. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B₁ in barley. **Analytica Chimica Acta**, v.520, p.159-164, 2004.
8. BADEA, M.; MICHELI, L. MESSIA, M. C.; CANDIGLIOTA, T.; MARCONI, E.; MOTTRAM, T; VELASCO-GARCIA, M.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. Aflatoxin M₁ determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system. **Analytica Chimica Acta**, v.520, p.141-148, 2004.

9. BARNA-VETRÓ, I.; SOLTI, L.; TÉREN, J.; GYÖNGYÖSI A.; SZABÓ, E.; WÖLFLING, A. Sensitive ELISA Test for determination of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.4071-4074, 1996.
10. BIO-RAD LABORATORIES. **Activated Immunoaffinity Supports**. Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, 2000.
11. BERG J.M., TYMOCZKO J.L., STRYER L. The molecular design of life. In: BERG J.M., TYMOCZKO J.L., STRYER L. **Biochemistry**. New York: W.H. Freeman and Co., 2002.
12. BLESÁ, J.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MARÍN, R.; MAÑES, J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1011, p.49-54, 2003.
13. BRADBURN, N.; COKER, R. D. A comparative study of solvent extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid phase columns on the determination of aflatoxin B₁. **Food Chemistry**, v.52, p.179-185, 1995.
14. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
15. 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.
16. CAST, Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa: Task Force Report N° 139, p. 36-128, 2003.
17. CHAN, D.; MACDONALD, S.J.; BOUGHTFLOWER, V.; BRERETON, P. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.1059, p.13-16, 2004.
18. CHANG, T.H.; STEPLEWSKI, Z.; KOPROWSKI, H. Production of monoclonal antibodies in serum free medium. **Journal of Immunological Methods**, v.39, p.369-375, 1980.

19. 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.
20. CHIAVARO, E.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BIANCARDI, A.; GAMBARELLI, E.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, v.937, p.31-40, 2001.
21. CHU, F. S.; LEE, R. C.; TRUCKSESS, M. W.; PARK, D. L. Evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay of cleanup for Thin-Layer Chromatography of aflatoxin B₁ in corn, peanuts, and peanut butter. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.71, n.5, p.953-956, 1988.
22. CHU, F. S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.47, p.562-569, 1984.
23. CHU, F.S.; UENO, I. Production of antibody against aflatoxin B₁. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.1125-1128, 1977.
24. CONG, J.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E. Immunoaffinity purification of the calpains. **Protein Expression and Purification**, v.25, p.283-290, 2002.
25. DANILOVA, N. P. ELISA screening of monoclonal antibodies to haptens: influence of the chemical structure of hapten-protein conjugates. **Journal of Immunological Methods**, v.173, p.111-117, 1994.
26. DAUPHINAIS, R. M. Solving and preventing problems in ligand assay. Section B - Immunoassay. In: ROSE, N. R.; FRIEDMAN, H.; FAHEY, J. L. (coords.). **Manual of Clinical laboratory immunology**. 3 ed. Washington, 1986. cap. 16, p.88-99.
27. DAVIS, N. D.; DICKENS, J. W.; FREIE, R. L.; HAMILTON, P. B.; SHOTWELL, O. L.; WYLLIE, T. D. Protocols for surveys, sampling, postcollection handling, and analysis of grain samples involved in mycotoxin problems. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.63, n.1, p.95-102, 1980.
28. DIÁRIO OFICIAL. Metodologia analítica para triagem e quantificação de aflatoxina total em milho por fluorimetria. **Diário oficial**, n.81, seção I, p.10-11, 2000.

29. DIETRICH, R.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E.; MARTLBAUER, E. Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins. **Natural Toxins**, v.3, p.288-293, 1995.
30. DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; GILBERT, J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.84, n.2, p.437-443, 2001.
31. EDINBORO, L. E.; KARNES, H. T. Determination of aflatoxins B₁ in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extraction coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1083, p.127-132, 2005.
32. ENTWISLE, A. C.; WILLIAMS, A. C.; MANN, P. J.; RUSSEL, J.; SLACK, P. T.; GILBERT, J. Combined phenylsilane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.84, n.2, p.444-450, 2001.
33. EVEN, M. S.; SANDUSKY, C. B.; BARNARD, N. D. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.3, p.105-108, 2006.
34. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Worldwid regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, v.81, p.9, 2004.
35. FAZEKAS, B.; TAR, A. Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.84, n.5, p.1453-1459, 2001.
36. FUJII, S. **Imunoensaio na detecção de ocratoxina A e efeito de caféina sobre microbiota fúngica**. 2002. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
37. FUJII, S. **Métodos imunoquímicos para detecção de ocratoxina A, produção de imunorreagente e aplicação em diferentes matrizes alimentares**. 2007. 100p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

38. GARDEN, S. R.; STRACHAN, N. J. C. Novel colorimetric immunoassay for the detection of aflatoxin B₁. **Analytica Chimica Acta**, v.444, p.187-191, 2001.
39. 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.
40. GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.62, p.579-585, 1979.
41. 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).
42. HARLOW E., LANE D. Immunoblotting. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 496, 1988 (d).
43. 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).
44. HARLOW E., LANE D. Protein Techniques. In: HARLOW E., LANE D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 673, 1988 (e).
45. 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).
46. HEFLE, S.L. Immunoassay fundamentals. **Food Technology**, v.49, n.2, p.102-107, 1995.
47. HEILMANN K., GROTH TH., BEHRING O., ALBRECHT W., SCHOSSIG M., LENDLEIN A., MICHEEL B. The influence of the chemical composition of cell culture material on the growth and antibody production of hybridomas cells. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 291-301, 2005.

48. HOLTZAPPLE, C. K.; BUCKLEY, S. A.; STANKER, L. H. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.754, p.1-9, 2001.
49. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. Lyon, France: IARC, v.56, 1993.
50. INTERNATIONAL VETERINARY INFORMATION SERVICE (IVISO). Disponível em: <<http://www.ivis.org/advances/Beasley/cpt10c/images/dna10.gif>> Acesso em outubro de 2006.
51. JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.1-10, 2000.
52. 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.
53. KAWAMURA, O.; NAGAYAMA, S.; SATO, S.; OHTANI, K.; UENO, I.; UENO, Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B₁ in peanut products. **Mycotoxin Research**, v.4, p.75-87, 1988.
54. 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.
55. 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.
56. KOBAYASHI, N.; SHIBUSAWA, K.; KUBOTA, K.; HASEGAWA, N.; SUN, P.; NIWA, T.; GOTO, J. Monoclonal anti-idiotypic antibodies recognizing the variable region of a high-affinity antibody against 11-deoxycortisol. Production, characterization and application to a sensitive noncompetitive immunoassay. **Journal of Immunological Methods**, v.274, n.1-2, p.63-75, 2003.

57. KOLOSOVA, A.Y.; SHIM, W.; YANG, Z.; EREMIN, S.A.; CHUNG, D. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. **Anal Bioanal Chem**, v.384, p.286-294, 2006.
58. 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.
59. KONDO, F.; MATSUMOTO, H.; YAMADA, S.; TSUJI, K.; UENO, Y.; HARADA, K.-I. Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water. **Toxicon**, v.38, p.813-823, 2000.
60. KREUTZ, F.T.; JAFARIN, A.; BIQQS, D.F.; SURESH, M.R. Production of highly pure monoclonal antibodies without purification using a hollow fiber bioreactor. **Hybridoma**, v.16, p.485-486, 1997.
61. LEE, N.A.; WANG, S.; ALLAN, R.D.; KENNEDY, I.R. A rapid aflatoxin B₁ ELISA: Development and Validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2746-2755, 2004.
62. 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.
63. LEITNER, A.; ZÖLLNER, P.; PAOLILLO, A.; STROKA, J.; PAPADOPOULOU-BOURAOUI, A.; JABOREK, S.; ANKLAM, E.; LINDNER, W. Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine. **Analytica Chimica Acta**, v.453, p.33-41, 2002.
64. LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A.M.; MISORE, A.; DECOCK, K.; RUBIN, C.; KENYA AFLATOXICOSIS INVESTIGATION GROUP. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p.1763-1767, 2005.
65. LIDDELL J.E, CRYER A. Tissue culture techniques. In: Liddell J.E, Cryer A. **A Practical Guide to Monoclonal Antibodies**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 7-31.

66. LIU, Z.; GAO, J.; YU, J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. **Journal of Stored Products Research**, v.42, p.468-479, 2006.
67. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
68. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Agricultura**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> > Acesso em 24 agosto de 2003.
69. MOGHADDAM, A.; LOBERSLI, I.; GEBHARDT, K.; BRAUNAGEL, M.; MERVIK, O. J. Selection and characterization of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naïve recombinant antibody libraries. **Journal of Immunological Methods**, v.254, p.169-181, 2001.
70. 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.
71. MORO, A. M.; RODRIGUEZ, M. T. A. Anticorpos monoclonais para a clínica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.22, p.32-35, set/out. 2001.
72. MYKOTOXINE. Disponível em: < <http://www.uni-bayreuth.de/departments/ddchemie/umat/mykotoxine/mykotoxine.htm> > Acesso em março de 2007.
73. 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 & Agricultural Immunology**, v.2, p.189-195, 1990.
74. 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.
75. NELSON, D. L.; COX, M. M. Structure and Catalysis: amino acids, peptides, and proteins. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000. Cap. 5, p. 120-121.

76. NEWSOME, W. H. Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods. Review: Immunochemical Methods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.69, n.6, p.919-923, 1986.
77. OLIVEIRA, A. Q.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; OLIVEIRA, A. Q. Survey of deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, and T2 toxin in popcorn hybrids planted in the state of São Paulo and in popcorn commercialized in the city of Campinas, SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p.330-333, 2001.
78. 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.
79. OSTROVE, S. Affinity chromatography: General Methods. In: DEUTSCHER, M. P. **Methods in Enzymology - Guide to Protein Purification**, v.182. London: Academic Press, 1990. section VII, 29, p.357-371.
80. OTTA, K. H.; PAPP, E.; BAGÓCSI, B. Determination of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.11-16, 2000.
81. PAL, A.; DHAR, T. K. An analytical device for on-site immunoassay. Demonstration of its applicability in semiquantitative detection of aflatoxin B₁ in a batch of samples with ultrahigh sensitivity. **Analytical Chemistry**, v.76, p.98-104, 2004.
82. PAPP, E.; OTTA, K.; ZÁRAY, G.; MINCSOVICS, E. Liquid chromatography determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, v.73, p.39-46, 2002.
83. 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-anthrolylnitrile. **Journal of Chromatography A**, v.989, p.257-264, 2003.
84. PESAVENTO, M.; DOMAGALA, S.; BALDINI, E.; CUCCA, L. Characterization of an enzyme linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ based on commercial reagents. **Talanta**, v.45, p.91-104, 1997.
85. PESTKA, J. J.; ABOUZIED, M. N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technology**, v.49, n.2, p.102-107, 1995.

86. 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.
87. PETTERSSON, H.; ABERG, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. **Food Control**, v.14, n.4, p.229-232, 2003.
88. PFEIFFER, N. E.; WYLIE, D. E.; SCHUSTER, S. M. Immunoaffinity chromatography utilizing monoclonal antibodies: Factors which influence antigen-binding capacity. **Journal of Immunological Methods**, v.97, p.1-9, 1987.
89. R-BIOPHARM RHÔNE Ltd. Disponível em < <http://www.r-biopharmrhone.com/pro/myco.html> > Acesso em abril de 2007.
90. SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v.13, p.87-92, 2002.
91. SALEEMULLAH; IQBAL, A.; KHALIL, I.A.; SHAH, H. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, v.98, p.699-703, 2006.
92. SAPSFORD, K. E.; TAITT, C. R.; FERTIG, S.; MOORE, M. H.; LASSMAN, M. E.; MARAGOS, C. M., SHRIVER-LAKE, L. C. Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B₁ in corn and nut products using the array biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v.21, p.2298-2305, 2006.
93. SASAKI, E.Y. Interferência de componentes alimentares na detecção de fumonisinas: ensaio imunoenzimático IC-ELISA em relação à cromatografia líquida de alta eficiência e camada delgada. 2000. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
94. SCOTT, P. M.; TRUCKSESS, M. W. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.80, n.5, p.941-949, 1997.
95. 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.

96. 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. **Analytical Chimica Acta**, v.457, p.199-209, 2002.

97. SIBANDA, L.; de SAEGER, S.; van PETEGHEM, C. Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. **Journal of Chromatography A**, v.959, n.1-2, p.327-330, 2002.

98. STANDER, M. A.; STEYN, P. S. Survey of ochratoxin A in South African wines. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v.23, n.1, p.9-13, 2002.

99. STOLL, T.S.; MÜHLETHALER, K.; von STOCKAR, U.; MARISON, I.W. Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production. **Journal of Biotechnology**, v.45, p.111-123, 1996.

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

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

102. 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 the Association of Official Analytical Chemists International**, v.84, n.4, p.1116-1123, 2001.

103. 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 the Association of Official Analytical Chemists International**, v.83, n.2, p.320-340, 2000a.

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

105. SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT, J. **Progress in Food Contaminants Analysis**. London: Blackie Academic & Professional, p.65-146, 1996.
106. 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 the Association of Official Analytical Chemists International**, v.79, n.2, p.472-475, 1996.
107. TARÍN, A.; ROSSEL, M. G.; GUARDINO, X. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A. **Journal of Chromatography A**, v.1047, p.235-240, 2004.
108. TAVČAR-KALCHER, G.; VRTAČ, K.; PESTEVŠEK, U.; VENGUŠT, A. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B₁ in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. **Food Control**, v.18, p.333-337, 2007.
109. 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, out. 2000.
110. TUOMOLA, M.; HARPIO, R.; MIKOLA, H.; KNUUTTILA, P.; LINDSTRÖM, M.; MUKKALA, V.-M.; MATIKAINEN, M.-T., LÖVGREN, T. Production and characterization of monoclonal antibodies against a very small hapten, 3-methylindole. **Journal of Immunological Methods**, v.240, p.111-124, 2000.
111. 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.
112. 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.
113. VENTURA, M.; GÓMEZ, A.; ANAYA, I.; DIAZ, J.; BROTO, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Determination of aflatoxins B₁, G₁, B₂ and G₂ in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1048, p.25-29, 2004.

114. VICAM. Manual de Instruções de Aflatest.
115. VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; GIROLAMO, A.; GIROLAMO, A. Determination of fumonisin B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column clean-up: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.84, n.6, p.1828-1837, 2001.
116. 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.
117. XIULAN, S.; XIAOLAN, Z.; JIAN, T.; ZHOU, J.; CHU, F. S. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B₁. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.185-194, 2005.
118. YAZDANPANA, H.; MIRAGLIA, M.; CALFAPIETRA, F. R.; BRERA, C.; RASEKH, H-R. Natural occurrence of mycotoxins in cereals from Mazandaran and Golestan Provinces. **Archives of Iranian Medicine**, v.4, n.3, p.107-114, 2001.
119. YONG, R. K.; COUSIN, M. A. Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. **International Journal do Food Microbiology**, v.65, p.27-38, 2001.
120. ZHAO, M.; LIU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; CHANG, W. Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples. **Journal Chromatography B**, v.783, p. 401-410, 2003.
121. WATANABE, E.; YOSIMURA, 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.
122. WEWETZER, K.; DILMAGHANI, K. Exposure to dimethyl sulfoxide at 37° C prior to freezing significantly improves de recovery of cryopreserved hybridoma cells. **Cryobiology**, v.43, p.288-292, 2001.
123. WHITAKER, T. B. Standardization of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control**, v.14, n.4, p.233-237, 2003.
124. WYATT, G. M. Immunoassays for food poisoning bacteria and bacterial toxins. Londres: Chapman & Hall, 1992.