

## Avaliação da coluna de imunoafinidade em desenvolvimento para detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> por espectrofluorimetria

### Evaluation of immunoaffinity column in development for aflatoxin B<sub>1</sub> detection by spectrofluorimetry

*Luciana Hayashi<sup>1</sup>, Cássia Reika Takabayashi<sup>1</sup>, Simone Fujii<sup>1</sup>,  
Ricardo Marcelo Reche Ribeiro<sup>1</sup>, Patrícia Sambatti<sup>1</sup>,  
Antônio Carlos Gerage<sup>2</sup>, Elisabete Yurie Sataque Ono<sup>3</sup>,  
Eiko Nakagawa Itano<sup>4</sup>, Osamu Kawamura<sup>5</sup>, Elisa Yoko Hirooka<sup>1</sup>*

---

#### Resumo

O monitoramento de aflatoxina B<sub>1</sub> depende de métodos analíticos rápidos de alta sensibilidade e especificidade. Considerando que a coluna de imunoafinidade (CIA) é essencial na etapa de limpeza e pré-concentração do analito, o trabalho objetivou desenvolver CIA empregando IgG anti-AFB<sub>1</sub> produzido pelo hibridoma linhagem AF4, imobilizado em suporte gel ativado Affi-Gel 10. A eficiência de CIA em desenvolvimento foi comparada com CIA comercial perante detecção de AB<sub>1</sub> em milho por espectrofluorimetria ( $\lambda$  de excitação e emissão de 360 e 420 nm, respectivamente). O anticorpo monoclonal (AcM) anti-AFB<sub>1</sub> produzido foi semi-purificado (82,18  $\mu$ g/mL) e utilizado na confecção da CIA. Testando a recuperação de AFB<sub>1</sub> em milho artificialmente contaminado com 5, 15 e 30 ng de AFB<sub>1</sub>/g, a coluna desenvolvida não foi eficaz (188,67%), se comparado a CIA comercial Aflatest-P (recuperação de AFB<sub>1</sub> de 72,40 a 79,77%). A reutilização após regeneração de coluna comercial mostrou

---

<sup>1</sup> Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. E-mail: hirooka@uel.br.

<sup>2</sup> Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar), Londrina, PR, Brasil.

<sup>3</sup> Depto. de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

<sup>4</sup> Depto. de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

<sup>5</sup> Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Kagawa, Japan.

Endereço para correspondência: Profa. Elisa Yoko Hirooka – Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos/CCA – Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário s/nº CEP: 86051-990 – Londrina, Paraná.

resultados variáveis, com 34,15 a 82,88% de recuperação de AFB<sub>1</sub>, indicando significativo erro na análise. Embora estes sejam dados preliminares, a redução de solventes tóxicos e possibilidade de reutilização justificam o desenvolvimento de CIA com melhoria direcionada principalmente ao capeamento, visando obter coluna específica, capaz de limpar o extrato alimentar em única etapa cromatográfica.

**Palavras-chave:** Aflatoxina B<sub>1</sub>, Anticorpo Monoclonal, Coluna de Imunoafinidade, Espectrofluorimetria

### Abstract

The monitoring of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) requires highly sensitive and specific rapid analytical methods. Taking to account the use of immunoaffinity column (IAC) is essential in the clean-up and pre-concentration step of the analyte, in this study the IAC was developed using anti-AFB<sub>1</sub> IgG produced by hybridoma cell line AF4, which was immobilized in Affi-Gel 10 support. The efficiency of IAC in development was compared with commercial IAC (Aflatest-P) to detect AFB<sub>1</sub> in corn by spectrofluorimetry (excitation-emission wavelength at 360 and 420 nm, respectively). Anti-AFB<sub>1</sub> monoclonal antibody (mAb) was semi-purified (82.18 g/mL), and it was used in the CIA manufacturing. AFB<sub>1</sub> recovery test in artificially contaminated corn with 5, 15 and 30 ng of AFB<sub>1</sub>/g indicated ineffectiveness of column in development (188.67%), when compared with commercial IAC (72.40 to 79.77%). The recovery of AFB<sub>1</sub> by regenerated commercial column ranged from 34.15 to 82.88%, indicating significant analysis error. Although of these preliminary data, the procedures avoiding the use of toxic solvents, with further reusing of such column can justify the development of IAC, targeted on improved end-capping, to reach high specific column to clean-up the food extract in a single chromatographic step.

**Key words:** Aflatoxin B<sub>1</sub>, monoclonal antibody, immunoaffinity column, spectrofluorimetry

---

## INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo a ocorrência freqüente em produtos agrícolas incluindo milho, trigo, amendoim, cevada, nozes, pimenta, arroz e em produtos de origem animal, devido à contaminação indireta por ração contaminada<sup>(1, 2, 3, 4)</sup>. ‘*International Agency for Research on Cancer*’ (IARC) classifica AFB<sub>1</sub> em Grupo 1, i.e. como carcinógeno para humano, devido a alta toxicidade, com adicional efeito carcinogênico, mutagênico, teratogênico e imunossupressivo<sup>(5)</sup>.

Minimização à exposição, aliada à condição adequada de produção e processamento dependem de rigoroso e eficiente programa de monitoramento em produtos agrícolas e animais. 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 controle de qualidade de matérias primas agropecuárias e produtos derivados<sup>(6, 7)</sup>. Inúmeros métodos para determinação de aflatoxinas têm sido desenvolvidos, baseados em Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com absorção-UV, fluorescência ou espectrometria de massa e ensaios imunoenzimáticos (ELISA)<sup>(8, 9)</sup>.

Análise cromatográfica é laboriosa, devido a sequência de operações amplas e complexas, incluindo amostragem, preparação de amostra, extração, purificação e concentração, quantificação e etapas de confirmação<sup>(1)</sup>, além de laboratórios com equipamentos especializados, operadores treinados e solventes tóxicos<sup>(9,10)</sup>. Métodos ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) têm vantagens pela simplicidade, alta sensibilidade, pouca ou nenhuma necessidade de limpeza ou concentração de analito, facilidade, uso de reagentes seguros e rapidez<sup>(9,10)</sup>. A desvantagem consiste na ocorrência de resultado falso-positivo devido à reação cruzada com matrizes alimentares, requerendo procedimentos confirmatórios<sup>(11,12)</sup>. A interferência de matriz pode ser minimizada pela diluição do extrato previamente ao ensaio, ou por meio de processo de limpeza<sup>(6, 13)</sup>.

A fluorimetria associada à etapa eficaz de limpeza baseado em CIA reduz o custo e melhora a velocidade de execução, uma vez que se trata de simples medida fluorimétrica de analito purificado aflatoxina<sup>(8)</sup>. A coluna de imunoafinidade (CIA), preparadas com anticorpos monoclonais anti-micotoxinas, destacam-se pela 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

solventes tóxicos, além da possibilidade de automatização da técnica e disponibilidade comercial<sup>(14, 15)</sup>.

O trabalho objetivou desenvolver CIA empregando IgG anti-AFB<sub>1</sub> e suporte gel ativado, bem como comparar a sua aplicabilidade com CIA comercial, tendo a espectrofluorimetria como método rápido e simples para a detecção de aflatoxina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Produção de anticorpo monoclonal IgG anti-AFB<sub>1</sub>*

O hibridoma linhagem AF4 secretora de anticorpo monoclonal-AcM específico para AFB<sub>1</sub> (isotipo IgG<sub>1</sub> lambda), derivada de mieloma linhagem SP2/0-AG14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, foi desenvolvido no *Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University*, Japão. Os hibridomas foram adaptados em meio RPMI 1640 (GIBCO Co., USA) suplementado com 10% SFB (37° C, 5% de CO<sub>2</sub>), seguido de adaptação gradual ao meio *Hybridoma-SFM* (H-SFM) (GIBCO Co., USA) suplementado com 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina<sup>(16)</sup>. A seguir, as células foram cultivadas em frascos de 150 cm<sup>2</sup> com inóculo inicial de 2,5 a 5 x 10<sup>4</sup> células/mL até atingirem saturação celular (aprox. 5 x 10<sup>5</sup> a 1 x 10<sup>6</sup> células/mL), centrifugadas (200 x g, 5 min), ressuspensas em meio fresco e incubadas a 37° C com 5% CO<sub>2</sub>. O volume celular foi ajustado com o meio para 1 x 10<sup>6</sup> células/mL e incubadas por aproximadamente 15 dias sem reposição de meio, até morte celular. O sobrenadante de cultivo com IgG anti-AFB<sub>1</sub> foi centrifugado (2400 x g, 10 min, 4° C) e armazenado a 4° C. O AcM foi precipitado com sulfato de amônio sob agitação lenta até concentração final de 40% de saturação (purificação parcial de IgG) e o precipitado obtido mantido a 4° C por 16 horas sob agitação, centrifugado (8000 x g, 30 min, 4° C) e ressuspensado em PBS (tampão fosfato de sódio, 1/10 do volume original da amostra concentrada). Em seguida, foi dialisada

(*cut-off* de 12000-16000 MM) empregando-se PBS (4 x 1 L) a 4° C por 16 horas, seguida de água ultra-pura (4 x 1 L). Após determinação de concentração protéica (IgG) a 280 nm ( $E_{280} = 1,35$ ), a solução de AcM foi congelada (-20° C), liofilizada (-50° C) e mantida a -20° C.

#### *Desenvolvimento de CIA para análise de AFB<sub>1</sub> empregando AcM anti-AFB<sub>1</sub>*

A CIA para análise de AFB<sub>1</sub> foi desenvolvida conforme instrução do fabricante, utilizando suporte ativado de imunoafinidade (*Activated Immunoaffinity Supports*) Affi-Gel 10 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) e AcM parcialmente purificado. Ao Affi-Gel 10 foi adicionado de AcM semi-purificado ressuspendido em tampão de ligação (NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 M, pH 8,5) (25 mg/mL) e incubado por 4 h a 4° C. O gel, após centrifugação, foi lavado com PBS e adicionado de 0,2 mL de glicina-etil-éster 1,0 M (pH 8,0) por 1 hora para bloquear as regiões não acopladas com anticorpo e, transferido para coluna e lavado com PBS até a negatividade de leitura a 280 nm. A coluna foi mantida a 4° C em PBS contendo 0,02% de azida sódica (NaN<sub>3</sub>). Previamente ao uso, a coluna foi lavada com metanol grau HPLC e re-equilibrada com PBS.

#### *Teste de recuperação de AFB<sub>1</sub> em CIA Affi-Gel 10 e CIA Aflatest-P (VICAM)*

Os grãos de milho (híbrido AG7000), safra 2005, foram fornecidos pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR, Londrina-PR). Cinquenta gramas de milho (48 *mesh*) foram artificialmente contaminados (5, 15 e 30 ng AFB<sub>1</sub>/g alimento) com AFB<sub>1</sub> (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) suspenso em 500 ng/mL em metanol e mantidas em repouso por 24 horas a 25° C. A extração procedeu-se conforme recomendação do manual da CIA comercial (Aflatest-P – VICAM Inc., Watertown, USA). O milho contaminado foi adicionado de 5 g de NaCl e 100 mL de metanol:água (80:20, v/v), agitada por 1 min (175 rpm) e filtrado em papel plissado (filtro qualitativo n° 1, Whatman International Ltd., Maistone, England). Ao extrato (10 mL) adicionou-se 40 mL de água

ultra-pura (diluição 1:4), filtrado (filtro de microfibras de vidro GF/C, Whatman International Ltd., Maistone, England) e 5 mL do extrato diluído submetido à limpeza pela CIA Affi-Gel 10 e pela CIA Aflatest-P a um fluxo contínuo de 1-2 gotas/seg. A coluna foi lavada com 10 mL de água ultra-pura (1-2 gotas/seg) e, a AFB<sub>1</sub> eluída de CIA Aflatest-P com 1,0 mL de metanol grau HPLC (1-2 gotas/seg), enquanto que para CIA desenvolvida usou-se 2 frações de 7,5 mL.

#### *Regeneração de CIA*

Após o uso, as CIAs (Affi-Gel e Aflatest-P) foram regeneradas conforme Nakajima *et al.* (1990)<sup>(17)</sup> 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.

#### *Quantificação de AFB<sub>1</sub> por espectrofluorimetria*

O elutato de CIA foi seco sob fluxo de N<sub>2</sub> gasoso e o resíduo ressuspendido em 200 µL de metanol. Uma alíquota de 100 µL foi adicionada de 100 µL de revelador (solução aquosa de bromo 0,003%, v/v) e após 60 seg, quantificado por espectrofluorimetria a 360 nm de excitação e 420 nm de emissão (Varian, Cary Eclipse, Austrália).

#### *Bloqueio de sítios ativos inespecíficos em CIA (capeamento)*

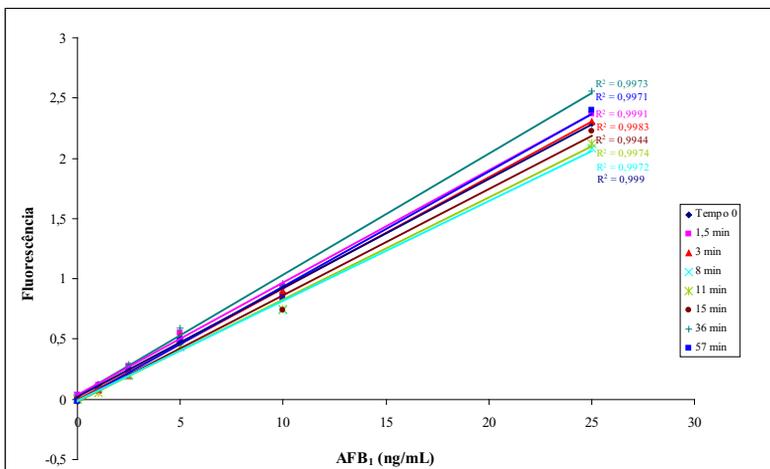
O teste preliminar para o bloqueio de sítios ativos no suporte de CIA empregou glicina-etil-éster 1M, pH 8,0<sup>(18)</sup> e leite desnatado 5% (p/v) em PBS<sup>(19)</sup>. A reação de capeamento com glicina-etil-éster foi conduzida por 1 hora a 25° C, enquanto a reação com leite desnatado foi incubada por 4 horas a 25° C. Em seguida, as CIAs foram lavadas com água ultra-pura e acondicionadas em PBS. O teste de recuperação de AFB<sub>1</sub> 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).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de AcM IgG anti-AFB<sub>1</sub> em meio H-SFM suplementado (2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomina) resultou no total de 7700 mL do sobrenadante de cultivo (82,18 µg/mL de proteína). Embora o cultivo de hibridoma em meio sintético forneça baixa concentração de IgG (50 µg/mL)<sup>(19)</sup>, o uso de L-glutamina, aliado à técnica de cultivo até morte celular aumentaram o teor protéico até 82,18 µg/mL.

O anticorpo, após concentração e purificação parcial com sulfato de amônio (40% de saturação), foi liofilizado e ressuscitado em volume menor (aproximadamente 5 a 7 mL, 27 mg/mL), para confeccionar a CIA anti-AFB<sub>1</sub>. A atividade de AcM específico para AFB<sub>1</sub> foi confirmada pelo teste de capacidade de retenção de AFB<sub>1</sub> (5,0 mL de solução 10 ng/mL) em CIA confeccionada. O AcM reteve 25,27 ng de AFB<sub>1</sub>, sendo este eluído com 15 mL de metanol.

A escolha do comprimento de onda de 360 nm para excitação e 420 nm para emissão para quantificação de AFB<sub>1</sub> por espectrofluorimetria baseou-se na maior leitura obtida durante análise de mesma solução, aliada a sensibilidade e estabilidade entre leituras consecutivas. O teste da estabilidade de fluorescência, i.e. variação na leitura de uma mesma amostra (AFB<sub>1</sub> recuperada) foi conduzida durante 57 min (Figura 1). A recuperação de AFB<sub>1</sub> para amostra contaminada com 5ng/g variou de 3,40 a 3,88 ng/g, enquanto que para 30ng/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).



**Figura 1.** Variação da fluorescência em função do tempo, utilizando 360 e 420 nm como comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente, para a detecção de AFB<sub>1</sub>.

O desempenho de CIA Affi-Gel 10 foi comparado à CIA comercial Aflatest-P quanto à eficiência no processo de limpeza e recuperação de AFB<sub>1</sub> em milho (Tabela 1). Comparando a efetividade de limpeza, a espectrofluorimetria mostrou baixa recuperação de AFB<sub>1</sub> (29,60 a 62,03%) por CIA Aflatest-P, enquanto CIA Affi-Gel 10 apresentou superestimação, ultrapassando 100% de recuperação (136,23 a 1146,20%), 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.

**Tabela 1.** Teste preliminar de recuperação de AFB<sub>1</sub> 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 CIA confeccionada com suporte Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB<sub>1</sub>, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB <sub>1</sub> adicionada (ng/g)	CIA Aflatest-P		CIA Affi-Gel 10	
	AFB <sub>1</sub> recuperada (ng/g)	Recuperação (%)	AFB <sub>1</sub> recuperada (ng/g)*	Recuperação (%)
0	0,19	---	---	---
5	1,48	29,6	57,31	1146,2
15	5,41	36,07	43,75	291,67
30	18,61	62,03	40,87	136,23

\*Soma de 2 frações de metanol contendo AFB<sub>1</sub> eluída da coluna(10 mL cada)

Procedendo teste de recuperação com 5 e 30 ng/g de AFB<sub>1</sub> em CIA Aflatest-P e 30 ng/g em CIA Affi-Gel 10, reduzindo o tempo de extração para 1 min, a Tabela 2 mostrou 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<sup>(20)</sup> obtiveram recuperação de AFB<sub>1</sub> 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). E análise utilizando Aflatest (VICAM) seguida de fluorimetria atingiu a recuperação de 79,27 a 122,92% de aflatoxina total em milho<sup>(21)</sup>.

**Tabela 2.** Teste de recuperação de AFB<sub>1</sub> 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).

AFB <sub>1</sub> adicionada (ng/g)	AFB <sub>1</sub> recuperada (ng/g)	Recuperação (%)
0	0,37	---
5	3,62	72,4
30	23,93	79,77

Segundo o fabricante, a coluna Aflatest-P deve ser usada uma única vez, não se recomendando a reutilização. Mesmo assim, uma avaliação da reutilização foi realizada com milho contaminado com 5 e 30 ng/g AFB<sub>1</sub>, sendo a coluna para 2º e 3º uso aleatoriamente escolhida entre as colunas já utilizadas, simulando uma análise de rotina (Tabela 3). No segundo uso, a recuperação de AFB<sub>1</sub> decaiu consideravelmente, passando de 72,40 para 34,15% na contaminação de 5ng/g e de 79,77 para 50,24% na contaminação de 30ng/g, indicando que não convém reutilizar a CIA Aflatest-P. 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. 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 proporcionar erros de análise, devendo-se analisar reprodutibilidade de CIA em duplicata.

**Tabela 3.** Teste de recuperação de AFB<sub>1</sub> 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 <sub>1</sub> adicionada (ng/g)	AFB <sub>1</sub> recuperada (ng/g)	Recuperação (%)
1	5	3,62	72,4
	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)

A Tabela 4 mostra o teste de recuperação de AFB<sub>1</sub> em CIA Affi-Gel 10 (milho com 30 ng/g AFB<sub>1</sub>). O resultado (188,67% de recuperação) indicou ineficácia de CIA Affi-Gel 10 na eliminação de compostos interferentes fluorescentes, devendo-se proceder bloqueio de ésteres ativos do gel, não acoplados com AcM, para impedir a ligação inespecífica do gel com interferentes de matriz alimentar<sup>(18, 22)</sup>.

**Tabela 4.** Teste de recuperação de AFB<sub>1</sub> 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-AFB<sub>1</sub>, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

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

\*Fração de metanol contendo AFB<sub>1</sub> eluída da coluna: 7,5 mL cada

O resultado preliminar de dois testes de bloqueio de sítios ativos do suporte da CIA utilizando glicina-etil-éster 1,0 M, pH 8,0 e 5% de leite desnatado em PBS (p/v) é apresentado na Tabela 5. Após 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.

**Tabela 5.** Teste de recuperação de AFB<sub>1</sub> em milho contaminado artificialmente com 5 ng/g, com limpeza de amostra em CIA confeccionada com suporte Affi-Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-AFB<sub>1</sub>, capeada com glicina-etil-éster ou leite desnatado, e quantificação por espectrofluorimetria (360-420 nm).

AFB <sub>1</sub> adicionada (ng/g)	Fração <sup>a</sup>	Agente de capeamento <sup>b</sup>	AFB <sub>1</sub> 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	

<sup>a</sup>Fração de metanol contendo AFB<sub>1</sub> eluída da coluna: 7,5 mL cada

<sup>b</sup>Reagente utilizado no capeamento de CIA Affi-Gel 10: glicina-etil-éster 1,0 M, pH 8,0; leite desnatado 5%

Conseqüentemente, a fluorescência detectada consistiu da soma de interferentes oriundos de reagente residual e componente do milho, obtendo falsa recuperação entre 658,60 a 1012,40%. O fato indicou que cuidados adicionais seriam necessários durante a fase de bloqueio, para permitir limpeza completa de amostra. Salienta-se também, que o AcM anti-AFB<sub>1</sub> usado no preparo de CIA esteja debilitado pelo processo de purificação e concentração envolvendo etapas de congelamento e descongelamento.

Embora a CIA Affi-Gel 10 confeccionada para análise de AFB<sub>1</sub> ainda seja ineficiente em comparação à CIA comercial Aflatest-P, o AcM anti-AFB<sub>1</sub> produzido apresentou-se específico contra AFB<sub>1</sub>, devendo-se prosseguir com estudo inserindo novas condições de bloqueio de sítios ativos do suporte da 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.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Mestrado. Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico), UGF – Fundo Paraná /SETI e Fundação /Araucária pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jaimez J, Fente CA, Vazquez BI, Franco CM, 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.
2. 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.
3. 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.
4. Calleri E, Marrubini G, Brusotti G, Massolini G, Caccialanza G. Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p.396-403, 2007.
5. Iarc. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Stryrene. **International Agency for Research on Cancer** 82 , 171-300, 2002.
6. Ono EYS, Kawamura O, Ono MA, Ueno Y, Hirooka EY. 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.

7. Whitaker TB. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control**, v.14, n.4, p.233-237, jun. 2003.
8. 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.
9. Ammida NHS, Micheli L, Palleschi G. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in barley. **Analytica Chimica Acta**, v.520, p.159-164, 2004.
10. Kolosova AY, Shim W, Yang Z, Eremin SA, Chung D. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. **Anal Bioanal Chem**, v.384, p.286-294, 2006.
11. Anklam E, Stroka J, Boenke A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v.13, p. 173-183, 2002.
12. Cho S-H, Lee C-H, Jang M-R, Son Y-W, Lee S-M, Choi I-S; Kim S-H, Kim D-B. Aflatoxins contamination in spices and processed spice Products commercialized in Korea. *Food Chemistry* , n.107 p. 1283-1288, 2008.
13. Fujii S. **Imunoensaio na detecção de ocratoxina A e efeito de cafeína sobre microbiota fúngica**. 2002. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
14. Otta KH, Papp E, Bagócsi B. Determination of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.11-16, 2000.
15. Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, Macdonald S, Crews C. Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants*, n. 25, v.2, p.152-163, 2008.
16. Bruce MP, Boyd V, Duch C, White JR. 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.

17. 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.
18. Bio-Rad Laboratories. **Activated Immunoaffinity Supports**. Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, 2000.
19. 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.
20. Yazdanpanah H, Miraglia M, Calfapietra FR, 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.
21. Brasil, 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.
22. 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.