

Micotoxinas em alimentos

Progressos na imunodeteção



Elisabete Yurie Sataque Ono

Dra., Prof., Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - Centro de Ciências Exatas
Universidade Estadual de Londrina
eysono@uel.br

Aline Maísa Mendes

Especialista em Bioquímica Aplicada
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Centro de Ciências Exatas,
Universidade Estadual de Londrina
alinempinheiro@yahoo.com.br

Paula Garcia Metrelles

Pós-graduanda do Programa de Mestrado em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas,
Universidade Estadual de Londrina
paulag@uel.br

Elisa Yoko Hirooka

Doutora, Professora, Depto. de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Estadual de Londrina
hirooka@uel.br

Mario Augusto Ono

Doutor, Professor, Departamento de Ciências Patológicas - Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina
marioono@uel.br

Fotos cedidas pelos autores

Introdução

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos que frequentemente contaminam produtos agrícolas, no campo, durante a colheita, transporte e estocagem. Estes compostos apresentam estruturas químicas diversas e são produzidos por fungos de campo e de estocagem, incluindo muitas espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 1) (Ayres, 1979).

Muitas micotoxinas são capazes de apresentar uma ampla gama de efeitos biológicos em várias espécies animais, incluindo o homem, em concentrações relativamente baixas (i.e., na faixa de mg/kg [ppm] a µg/kg [ppb]).

A ocorrência natural de micotoxinas em grãos de cereais pode, além dos problemas de saúde, ter implicações econômicas importantes para diversos setores comerciais incluindo produtores de grãos, criadores de animais e aves, assim como processadores de alimentos e rações (Pestka et al., 1995). As perdas acarretadas podem advir da baixa qualidade dos grãos (Figura 2), baixa produtividade, baixa performance animal e/ou necessidade de descontaminação dos grãos.

Segundo uma estimativa da FAO (Food and Agriculture Organization) anualmente cerca de 25% do suprimento alimentar mundial é contaminado por micotoxinas. Os riscos à saúde humana associada à ocorrência natural de determinadas micotoxinas resultaram na adoção de medidas de controle em alguns países (FAO, 1997).

O principal meio de eliminar micotoxinas consiste em detectar e desviar as matérias-primas contaminadas de produtos destinados ao consumo humano e animal. A vigilância analítica permite identificar regiões geográficas onde as micotoxinas constituem um problema recorrente, além de fornecer uma base de dados sobre a exposição humana em estudos epidemiológicos (Pestka et al. 1995).

Uma vez que o problema relacionado às micotoxinas é difícil de ser evitado, as medidas mais efetivas de controle dependem de um rigoroso programa para monitorar a contaminação em alimentos e rações (Chu, 1984).

Os métodos para análise de micotoxinas incluem cromatografia de camada delgada (Stockenström et al., 1994), cromatografia gasosa (Sydenham et al., 1990), cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (Plattner et al., 1990) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shephard et al., 1990). Embora a CLAE tenha sido adotada como um método oficial

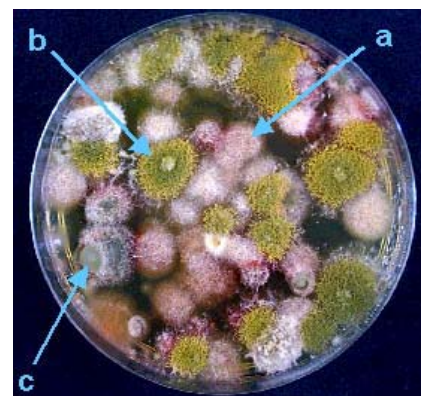


Figura 1. Colônias de *Fusarium* spp. (a), *Aspergillus* spp. (b) e *Penicillium* spp. (c) em ágar batata dextrose

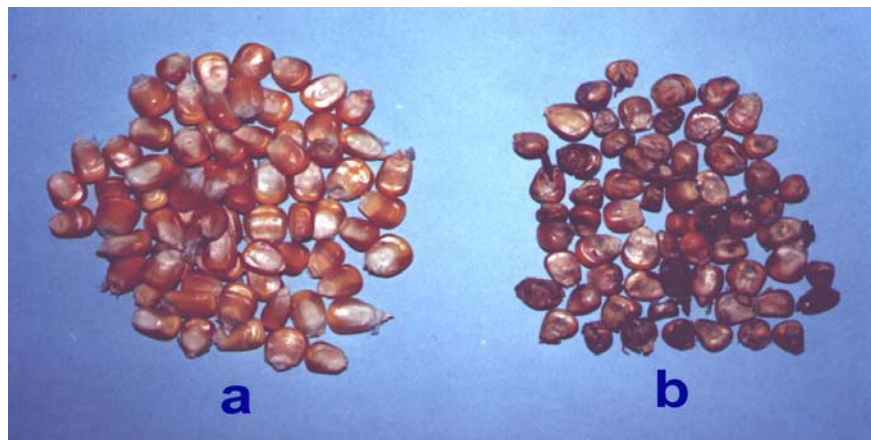


Figura 2. Grãos de milho de boa qualidade (a) e de baixa qualidade (b)

para análise de micotoxinas (Sydenham et al., 1996a,b), requer instrumentação de alto custo, pessoal altamente treinado, uma pré-limpeza extensiva da amostra, tornando cada análise muito demorada.

Nos últimos anos, ocorreu um grande avanço no uso de imunoensaio na análise de micotoxinas devido à especificidade, sensibilidade e simplicidade aliadas à rapidez e a possibilidade de análise de um grande número de amostras simultaneamente (Hefle, 1995).

Em seguida serão descritos os princípios básicos de imunoensaio e alguns dos desenvolvimentos mais recentes na aplicação de técnicas imunológicas para a determinação de micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas).

Conceitos básicos

Os imunoensaio são procedimentos analíticos baseados na ligação não covalente entre antígeno e anticorpo, e podem ser desenvolvidos para detectar o antígeno ou o anticorpo. Os imunoensaio utilizados na área de alimentos são baseados na pesquisa de antígenos.

Os imunoensaio podem ser realizados com anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais e anticorpos recombinantes.

Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais são obtidos pela imunização de um animal (coelho, carneiro, cabra, cavalo) e purificados posteriormente a partir do

soro imune.

A estimulação de linfócitos B induz a produção de anticorpos. Cada clone de linfócito produz anticorpo de uma determinada especificidade, portanto a estimulação de muitos linfócitos do organismo determina a produção de muitos anticorpos diferentes, com diferentes especificidades e afinidades. O soro obtido de um animal imunizado contém anticorpos produzidos por diferentes clones de linfócitos B e, portanto, é denominado anticorpo policlonal (Abbas, 2000).

Os anticorpos policlonais são relativamente fáceis de produzir e apresentam alta afinidade, porém podem apresentar reações cruzadas.

Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são produzidos por hibridomas, que são obtidos pela fusão de linfócito B com célula tumoral (mieloma). O hibridoma tem a capacidade de proliferar, produzindo anticorpos monoclonais em grandes quantidades (Abbas, 2000).

Os anticorpos monoclonais oferecem vantagens como afinidade e especificidade de ligação, homogeneidade e capacidade de serem produzidos em quantidades ilimitadas (Deshpande, 1996).

Anticorpos recombinantes

Recentemente, foi desenvolvido um novo método de produção de anticorpos com grande potencial. O método é baseado em técnicas de biologia molecular e consiste no isola-

mento e recombinação dos genes que codificam a região variável dos anticorpos (Lee & Morgan, 1993). Esta técnica apresenta vantagens como baixo custo e possibilidade de manipulação do DNA que codifica para o anticorpo a fim de melhorar características como afinidade e especificidade (Yau et al., 2003).

Princípios de imunoensaio

Inicialmente o radioimunoensaio foi o método mais utilizado para quantificação de micotoxinas, porém, devido a problemas relacionados à manipulação de material radioativo e o reduzido tempo de prateleira dos reagentes foi substituído pelos ensaios imunoenzimáticos (Pestka et al., 1995).

Imunoensaio que utilizam antígeno ou anticorpo marcado com uma enzima são denominados ensaios imunoenzimáticos, entre os quais o mais empregado é o método de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).

O ensaio imunoenzimático é um método em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada pela medida da atividade enzimática, utilizando a conversão de um substrato (cromogênico, fluorescente ou quimioluminescente) por um antígeno ou anticorpo marcado com a enzima como meio de detecção/quantificação do analito (Gazzaz et al., 1992). Os imunoensaio apresentam alta sensibilidade, especificidade e facilidade na execução e permitem a quantificação do analito em níveis de ng ou pg.

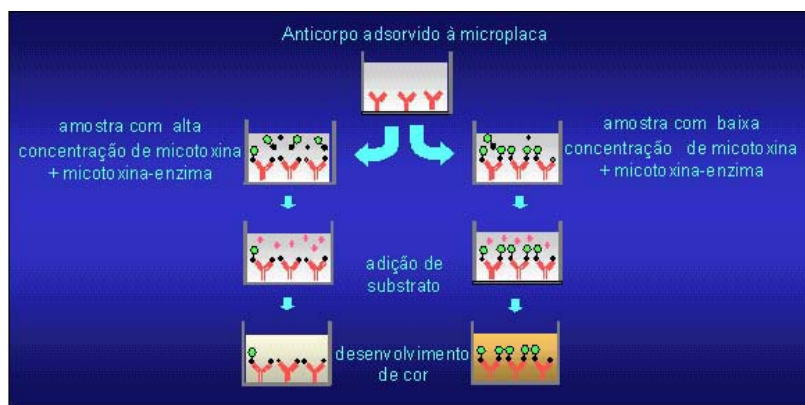
A enzima utilizada no ELISA deve apresentar alta atividade específica e o produto da reação enzimática deve ser estável, de fácil quantificação, facilmente conjugada a vários antígenos, anticorpos e haptenos, sem perda da atividade e ter custo acessível (Sanchez, 1998).

Várias enzimas podem ser utilizadas no ELISA, como peroxidase, fosfatase alcalina, β -galactosidase, entre outras (Gazzaz et al., 1992).

Tipos de ELISA

Atualmente, os tipos de ELISA mais empregados para análise de substâncias biologicamente ativas, como

Figura 3. ELISA competitivo direto (dc-ELISA)



as micotoxinas, são ELISA competitivo direto e ELISA competitivo indireto.

tensidade da cor desenvolvida (Hefle, 1995).

ELISA competitivo direto (dc-ELISA)

No dc-ELISA, as microplacas são sensibilizadas com anticorpo específico para a micotoxina, incubadas com o conjugado micotoxina-enzima, na presença da amostra em que se deseja pesquisar a micotoxina (Figura 3). Após a obtenção do equilíbrio da reação antígeno-anticorpo é adicionado o substrato da enzima. Há uma relação inversamente proporcional entre a concentração de micotoxina na amostra e a intensidade da cor desenvolvida (Sanchez, 1998).

O dc-ELISA é um método fácil e rápido para detecção de micotoxinas, visto que a amostra e o conjugado (micotoxina conjugada à enzima) podem ser adicionados ao mesmo tempo (Gazzaz et al, 1992).

ELISA competitivo indireto (ic-ELISA)

No ic-ELISA o anticorpo específico (anticorpo primário) para a micotoxina é incubado com a amostra em uma microplaca sensibilizada com a micotoxina (Figura 4). Quanto maior a concentração de micotoxina na amostra, menos anticorpo livre estará disponível para ligar-se à micotoxina fixada à microplaca. A quantidade de anticorpo primário ligado à placa pode ser estimada pela incubação com anticorpo secundário marcado com enzima, específico para o anticorpo primário, seguida de adição do substrato. A concentração de micotoxina na amostra é inversamente proporcional à in-

Aplicação de técnicas imunoquímicas

Diversos métodos imunoquímicos têm sido aplicados na detecção de micotoxinas, incluindo ELISA, colunas de imunoafinidade, métodos que empregam membranas, imunofiltração e biosensores (Tabela 1).

As técnicas de ELISA são amplamente utilizadas na análise de lotes de amostras e podem fornecer resultados qualitativos baseados no desenvolvimento de cor pela reação enzimática com um substrato cromogênico, ou semiquantitativo/quantitativo pela determinação espectrofotométrica. A principal desvantagem do ELISA resulta das interações inespecíficas de componentes alimentares (proteínas, ácidos graxos) com o anticorpo, que podem causar reações falso-positivas ou superestimação da concentração de micotoxinas (Hefle, 1995; Barna-Vetró et al., 1996). As interferências podem ser minimizadas pela diluição das amostras antes do ensaio, ou pela inclusão de uma etapa de pré-limpeza (Pestka et al., 1994; Barna-Vetro et al., 1996; Ono et al., 2000).

Recentemente a "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC) validou diversos métodos analíticos baseados na pré-limpeza do extrato alimentar por coluna de imunoafinidade antes da análise por CLAE (Burdaspal et al., 2001; Dragacci et al., 2001; Entwisle et al., 2001; Visconti et al., 2001). A utilização de cromatografia em camada delgada (CCD) associada a colunas de imunoafinidade é um procedimento promissor com desem-

penho comparável à CLAE (Stroka & Anklam, 2002), principalmente se a CCD de alta performance for utilizada (Valenta, 1998). A desvantagem em relação ao elevado custo das colunas de afinidade comerciais tende a ser minimizada pelo processo de regeneração da coluna (Scott & Trucksess, 1997; Fazekas & Tar, 2001; Watanabe et al., 2001; Kondo et al., 2002).

Os limites regulatórios cada vez mais rigorosos sobre os níveis de contaminação de micotoxinas por países importadores de grãos aumentaram a demanda por métodos rápidos e confiáveis para condições de campo. Diversos métodos que empregam membranas ("dip-sticks", tiras imunocromatográficas, dispositivos de fluxo) foram desenvolvidos para aplicação no campo (De Saeger & Van Peteghem, 1996; Sibanda et al., 2000; Ho & Wauchope, 2002). Entretanto, geralmente esses métodos apresentam baixa sensibilidade e são inadequados para a análise de grande número de amostras. Ultimamente, houve um progresso expressivo em bio-sensores tais como "surface plasmon resonance" (SPR), sondas de fibra óptica e ensaios baseados em micropartículas (Carlson et al., 2000; Daly et al., 2000; Maragos, 2002; Nasir & Jolley, 2002), mas apenas uma amostra pode ser avaliada de cada vez. As principais limitações desses métodos consistem na baixa reutilização da imunosuperfície e elevado consumo de reagentes (Gonzalez-Martinez et al., 1999).

Aflatoxinas

As aflatoxinas, compostos heterocíclicos consistindo de diidrofurano ou tetraidrofurano ligado a uma cumarina substituída (Figura 5), são produzidas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (Stoloff, 1976). Os principais membros deste grupo de micotoxinas consistem de quatro toxinas que ocorrem naturalmente, AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, juntamente com seus produtos metabólicos (AFM₁, AFM₂, AFP₁, AFQ₁ e aflatoxicol) produzidos pelos sistemas metabólicos microbianos e animais (Bradburn et al., 1993).

As aflatoxinas são encontradas como contaminantes de milho, aveia, cevada, amendoim e outras nozes,

especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições de temperatura e umidade são ótimas para o crescimento do fungo e para a produção da toxina (Rustom, 1997).

As aflatoxinas provocam sintomas tóxicos agudos em várias espécies de animais, e o fígado é o alvo principal (Wogan, 1969). A AFB₁ apresenta atividade teratogênica, mutagênica e hepatocarcinogênica, por meio da ativação metabólica para a forma epóxido, que pode se ligar covalentemente ao DNA. Devido à associação com o câncer hepático primário foi classificada pela "International Agency for Research on Cancer" (IARC) como carcinógeno do grupo 1 (IARC, 2002).

Dentre as micotoxinas para as quais os limites legais de contaminação já foram estabelecidos, as aflatoxinas são as mais amplamente reguladas. A "Food and Agriculture Organization" (FAO, 1997) relatou 77 países onde existe alguma forma de controle para aflatoxinas. Em países onde o regulamento especifica apenas o nível de AFB₁, os níveis permitidos se encontram numa faixa de zero detectável a 50 µg/kg, sendo que a maioria é de 5 µg/kg. Além dos níveis de AFB₁, alguns países regulam os níveis de aflatoxinas totais dentro da mesma faixa de concentração.

A aflatoxina M₁ é um derivado hidroxilado da AFB₁, sendo produzida e excretada no leite de animais que consomem ração contaminada com AFB₁. A preocupação existente acerca da AFM₁ advém de sua semelhança estrutural com a AFB₁ e também do fato das crianças estarem entre os maiores consumidores de leite (Gremmels, 1999). A AFM₁ foi classificada como carcinógeno do grupo 2B (possivelmente carcinogênico para seres humanos) (IARC, 2002).

Anticorpos policlonais e monoclonais para aflatoxinas foram desenvolvidos para utilização em ic-ELISA e dc-ELISA (Morgan et al., 1983; Chu et al., 1987; Kawamura et al., 1988; Li et al., 1994; Aldao et al., 1995; Devi et al.,

1999; Thirumala-Devi et al., 2002; Lipigorngoson et al., 2003).

Lipigorngoson et al. (2003) desenvolveram um dc-ELISA baseado em anticorpos monoclonais para detecção de AFB₁ com um limite de detecção de 4 µg/kg, recuperação de 88,1% a 99,5%. Os coeficientes de correlação com kit de ELISA comercial e CCD foram 0,912 e 0,802 para milho, 0,941 e 0,832 para amendoim, respectivamente (p<0,05). A triagem de contaminação de milho e amendoim tailandês empregando esse ensaio demonstrou níveis médios de AFB₁ (por cento positivos) de 73 µg/kg (85,7%) em milho e 102 µg/kg (67,9%) em amendoim.

µg/kg foram analisadas por CLAE, fluorimetria e ELISA. A pré-limpeza das amostras foi realizada por colunas de imunoafinidade antes da análise por CLAE e fluorimetria. A correlação entre fluorimetria e CLAE foi de 0,978, e ambos os métodos apresentaram elevada percentagem de recuperação e pequena variabilidade, enquanto o ELISA seria aplicável apenas como um método de triagem (Nilüfer & Boyacıoğlu, 2002).

Gathumbi et al. (2003) desenvolveram um método sensível para detecção rápida de AFB₁ em fígado de galinhas, e avaliaram a eficácia da cromatografia de imunoafinidade (IAC) antes da análise por dc-ELISA. O limite de detecção variou de 15 a 17 pg/mL, com recuperação de AFB₁ de 54,3% a 65,5% em tecidos artificialmente contaminados com 1 a 5 ng/g, respectivamente. A sensibilidade e especificidade em amostras artificialmente contaminadas (1 ng/g AFB₁) foram 100% para amostras submetidas à IAC e, 91,7% e 100%, respectivamente, para amostras não submetidas à IAC.

Pal & Dhar (2004)

desenvolveram um dispositivo analítico simples para a realização de um ensaio de imunofiltração para detecção de baixas concentrações de AFB₁ em alimentos. O dispositivo consistia de tiras de membrana, contendo zonas de anticorpos imobilizados em um cartão de polietileno. O método era baseado na amplificação do sinal envolvendo tiramina biotinilada e conjugado avidina-peroxidase, utilizando 4-cloro-1-naftol como substrato. A quantificação foi determinada por densitometria (limite de detecção de 0,01 ng/mL), com recuperação média a partir de diferentes alimentos entre 91% e 104%, e alta correlação com CLAE (r² = 0,99) em amostras de milho e amendoim artificialmente contaminadas. Um lote de 12 amostras foi analisado em um único cartão em 12 minutos.

Uma membrana de nitrocelulose montada sobre uma tira de plástico foi

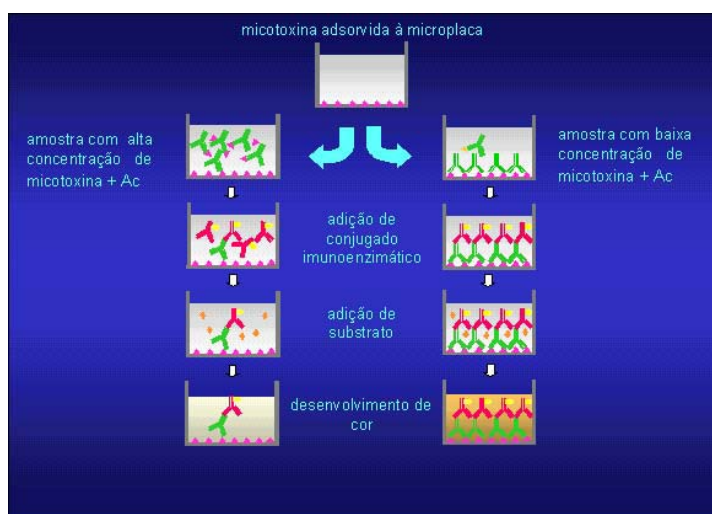


Figura 4. ELISA competitivo indireto (ic-ELISA)

Ono et al. (2001) analisaram 150 amostras de milho das regiões Centro-Sul, Centro-Oeste e Norte do Estado do Paraná, utilizando ic-ELISA baseado em anticorpos policlonais (C-Kure, CENSA) para triagem qualitativa de AFB₁, seguida da determinação quantitativa por dc-ELISA baseado em anticorpos policlonais (Veratox, Neogen). As amostras positivas para aflatoxinas variavam de 38-460 ng/g, com uma concentração média de 191 ng/g. Apenas 17 das 86 amostras da região Centro-Oeste estavam contaminadas com AFB₁. As amostras das regiões Norte e Centro-Sul não apresentaram contaminação.

Amostras de pasta de gergelim contaminadas artificialmente com aflatoxinas em níveis de 6,5, 13,0, e 19,5

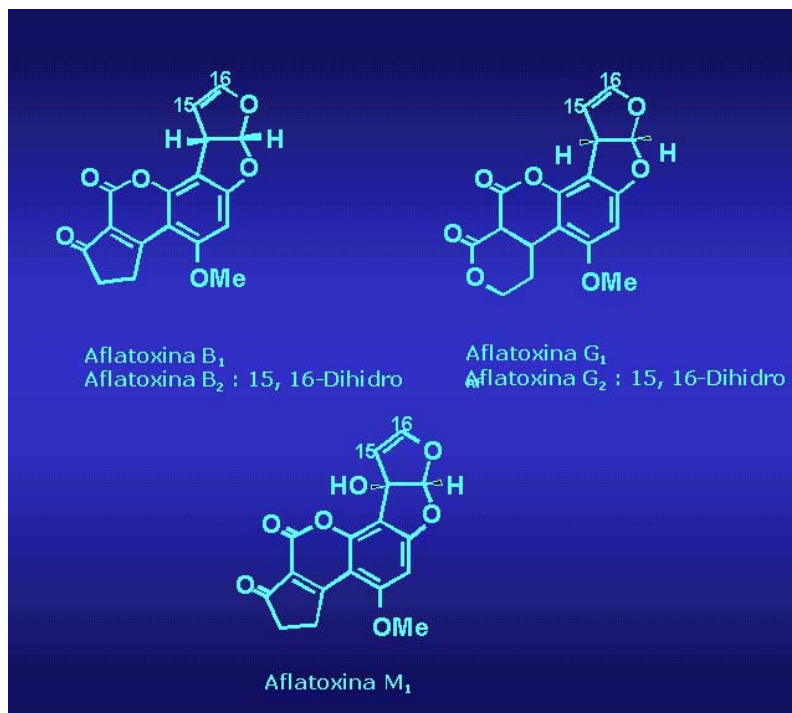


Figura 5. Estruturas químicas das principais aflatoxinas

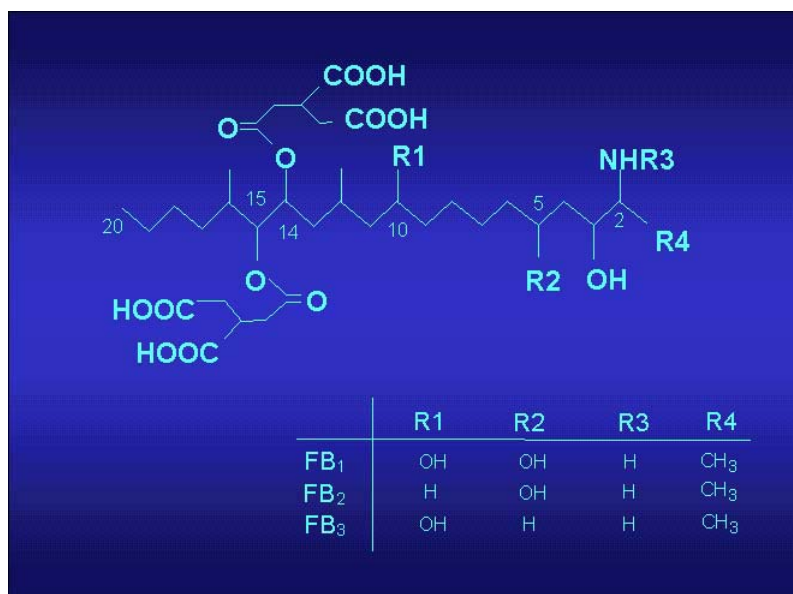


Figura 6. Estruturas químicas das principais fumonisinas

utilizada como base para detecção de < 20 ng de AFB₁ marcada com lipossomos contendo um corante (Ho & Wauchope, 2002). Neste método, a amostra migra ao longo da tira por capilaridade em uma área contendo anticorpos imobilizados, então a AFB₁ marcada com lipossomos contendo corante migra pela mesma área com a subsequente ligação com os anticorpos que não se ligaram à AFB₁ da amostra, desenvolvendo uma coloração intensa.

Um imunoenensaio colorimétrico para detecção de AFB₁ baseado na

injeção sequencial de amostras (SIIA), utilizando uma célula de fluxo circular empacotada em uma fase sólida de polimetilmetacrilato, apresentou um limite de detecção de 0,2 ng/mL em amostras de alimentos artificialmente contaminados (Garden & Strachan, 2001). Esta sensibilidade é comparável à sensibilidade do ELISA em microplaca, com a vantagem de ser realizado em apenas dez minutos, enquanto o ELISA demora 2 horas. A desvantagem do novo sistema é a realização de análises sequenciais de no máximo 15 amostras, enquanto o ELISA permite a

análise de dezenas de amostras ao mesmo tempo.

Diversos trabalhos sobre a performance de kits para determinação de aflatoxinas foram realizados (Dorner & Cole, 1989; Koeltzow & Tanner, 1990; Beaver et al., 1991; Sabino et al., 1997; Oliveira et al., 2000). Hongyo et al. (1992) comparando a análise de extratos de milho por dc-ELISA baseado em anticorpos monoclonais com CCD e CLAE, encontraram coeficientes de correlação de 0,93 e 0,95, respectivamente, quando o nível de contaminação era até 200 µg/kg.

Oliveira et al. (2000) compararam as técnicas de CCD com quantificação visual e densitométrica e ELISA, para análise de aflatoxinas em amostras de milho naturalmente contaminadas. As concentrações de aflatoxinas totais encontradas pelas técnicas de CCD e ELISA apresentaram maior frequência na faixa de 0-30 µg/kg e acima de 300 µg/kg. Os coeficientes de correlação entre os métodos foram altamente significativos para as relações entre as quantificações visual e densitométrica (r=0,92), ELISA e visual (r=0,83), ELISA e densitometria (r=0,74), na determinação de aflatoxinas totais em todas as amostras de milho pesquisadas, confirmando haver equivalência das técnicas estudadas.

Sabino et al. (1997) avaliaram a eficiência de dois kits de ELISA (Cite Probe Aflatoxin Test Kit-Idexx) para detecção de AFB₁ em níveis de 5 e 20 ng/g em comparação à CCD. Os kits de ELISA apresentaram resultados falso-positivos indicando que o método de ELISA pode superestimar os níveis de aflatoxinas, demonstrando a necessidade de confirmar resultados positivos. Resultados falso-negativos foram encontrados em amostras com traços de aflatoxinas e, portanto, abaixo do limite de detecção dos kits. Os resultados obtidos permitiram concluir que os kits mostraram-se adequados para testes de triagem de AFB₁ em amostras de milho, ração, amendoim e seus derivados.

Diversos estudos colaborativos sobre kits de ELISA e colunas de imunoafinidade têm sido relatados desde 1988 (Mortimer et al., 1988; Park et al., 1989; Trucksess et al., 1989; Patey et al., 1992; Trucksess & Stack, 1994;

Tabela 1. Limites de detecção de diferentes tipos de imunoenaios para aflatoxinas e fumonisinas

Micotoxina	Tipo de imunoensaio	Limite de detecção	Referência
AFB ₁	ELISA (Cite Probe)	5 ng/g	Sabino et al. (1997)
AFB ₁	dc-ELISA	4 ng/g	Lipigornngoson et al. (2003)
AFB ₁	Imunofiltração	0,01 ng/mL	Pal & Dhar (2004)
AFB ₁	SIIA ^b	0,2 ng/mL	Garden & Strachan (2001)
AFM ₁	Ensaio imunoenzimático de análise em fluxo	0,05 ng/mL	Sibanda et al. (1999)
AFM ₁	cd-ELISA (Ridascreen)	0,01 ng/mL	López et al. (2003)
FB ₁	cd-ELISA	7,6 ng/g	Barna-Vetró et al. (2000)
FB ₁	FILIA ^c	1 ng/mL	Ho & Durst (2000)
FB ₁	Polarização de fluorescência	500 ng/g	Maragos et al. (2001)
FB ₁	Biosensor (SPR) ^d	50 ng/mL	Mullet et al. (1998)
FBs totais ^a	ic-ELISA	93 ng/g	Ono et al. (2000)
FBs totais ^a	cd-ELISA	1000 ng/g	Desjardins et al. (2000)
FBs totais ^a	cd-ELISA	5 ng/g	Kim et al. (2002)
FBs totais ^a	cd-ELISA (Veratox)	200 ng/g	Castelo et al. (1998)
FBs totais ^a	cd-ELISA (Ridascreen)	3 ng/mL	Torres et al. (1998)
FBs totais ^a	cd-ELISA (Ridascreen)	3,4 ng/g	Danielsen & Funck-Jensen (1998)

^aFBs totais: Fumonisinas totais^bSIIA: Imunoenensaio de injeção sequencial^cFILIA: “*Flow-injection liposome immunoanalysis*”^dSPR: “*Surface Plasmon Resonance*”

Patey et al., 1991; Trucksess et al., 1990, 1991; Barmark & Larsson, 1994). A coluna de imunoafinidade Aflatest-P acoplada à fluorimetria ou CLAE foi adotada como método oficial pela AOAC para aflatoxinas totais em milho, amendoim e pasta de amendoim em concentrações $\geq 10 \mu\text{g/kg}$ (Trucksess et al., 1991).

Souza et al. (1999) avaliaram um kit de cd-ELISA (Ridascreen, R-Biopharm) na detecção e quantificação de AFM₁ em leite e relataram uma eficiência qualitativa, sensibilidade elevada e especificidade considerável. Na faixa de contaminação de 0,019 a 0,090 $\mu\text{g/L}$ o kit apresentou exatidão e precisão, porém para níveis de contaminação de 0,200 a 0,970 $\mu\text{g/L}$ não foi observada a mesma eficiência.

López et al. (2003) analisaram AFM₁ em 77 amostras de leite da Argentina, empregando o kit comercial dc-ELISA (Ridascreen, R-Biopharm) e observaram que 23% das amostras estavam contaminadas com AFM₁ em níveis de 0,01 a 0,03 $\mu\text{g/L}$. Sarimehmetoglu et al. (2003) também empregaram o kit de dc-ELISA (Ridascreen, R-Biopharm) para a detecção de AFM₁ em 400 amostras de queijos consumidos na província de Ankara (Turquia) e relataram contaminação de 81,75%,

sendo que 27,5% apresentaram níveis que excediam os limites legais de 250 ng/kg.

Sibanda et al. (1999) desenvolveram um novo ensaio imunoenzimático baseado em um sistema de fluxo através de membrana, que foi acoplado a uma coluna de imunoafinidade. O limite de detecção visual foi de 0,05 ng/mL de AFM₁ no leite e o tempo total de ensaio foi de 30 minutos. A reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais anti-AFM₁ foi de 100, 20, 74 e 57% contra AFM₁, AFM₂, AFB₁ e AFB₂, respectivamente.

Um ic-ELISA baseado em anticorpos policlonais foi desenvolvido para detecção de AFM₁ em leite e derivados. O ensaio apresentou resultados precisos em concentrações de AFM₁ superiores a 0,25 ng/mL, e a reação cruzada foi de 5% para AFB₁ e menor que 5% para AFB₂, AFG₁ e AFG₂; não houve reação cruzada com a ocratoxina A (Thirumala-Devi et al., 2002).

Fumonisinas

As fumonisinas constituem um grupo de metabólitos secundários produzidos por *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e outras espécies rela-

cionadas morfológicamente. Vinte e oito análogos de fumonisinas foram caracterizados, porém fumonisina B₁ (FB₁), FB₂ e FB₃ são os principais contaminantes naturais de milho e derivados (Rheeder et al., 2002).

As fumonisinas causam leucoencefalomalacia em eqüinos (Kellerman et al., 1990) e edema pulmonar em suínos (Harrison et al., 1990). Em seres humanos, altos níveis de fumonisinas em derivados de milho têm sido associados com câncer esofágico na África do Sul e China (Rheeder et al., 1992; Chu & Li, 1994). As toxinas de *F. verticillioides* foram classificadas pela “International Agency for Research on Cancer” como possivelmente carcinogênicas para seres humanos (IARC, 2002).

Embora os limites legais para as fumonisinas não tenham sido estabelecidos, o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda 5, 10, 50 e 50 $\mu\text{g/g}$ para ração de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (Munkvold & Desjardins, 1997). A Suíça recomenda o limite de 1 $\mu\text{g/g}$ para derivados de milho destinados ao consumo humano (Visconti & Boenke, 1995)

Anticorpos policlonais e mono-

clonais para fumonisinas foram produzidos para aplicação em dc-ELISA e ic-ELISA (Azcona-Olivera et al. 1992a, b; Usleber et al., 1994; Iijima et al., 1996; Yeung et al., 1996; Yu & Chu, 1996; Barna-Vetró et al., 2000; Christensen et al., 2000).

Um dc-ELISA baseado em anticorpos monoclonais desenvolvido para detecção de FB₁ em cereais (Barna-Vetró et al., 2000) apresentou um limite de detecção de 7,6 ng/g FB₁ e uma reatividade cruzada média de 100%, 91,8%, e 209% para FB₁, FB₂, e FB₃, respectivamente. A recuperação da toxina a partir de cereais artificialmente contaminados em níveis de 50-200 ng/g FB₁ variou de 61% a 84%.

Kulisek & Hazebroek (2000) desenvolveram um cd-ELISA empregando anticorpos policlonais para a triagem rápida de contaminação por FB₁. Esse ensaio foi aplicado num estudo comparativo para determinar a eficiência de extração de FB₁ em água deionizada, tampão fosfato salina (PBS), PBS-Tween e em solventes orgânicos (70% metanol, 50% acetonitrila) utilizando 16 amostras de milho. O tampão fosfato mostrou-se adequado para a extração de FB₁. As determinações realizadas por ELISA apresentaram boa correlação ($r = 0,94$) com CLAE em amostras artificialmente contaminadas entre 1 e 50 mg/mL de extrato.

Desjardins et al. (2000) avaliaram a ocorrência de fumonisinas em milho nepalense por dc-ELISA baseado em anticorpos monoclonais e os níveis de fumonisinas foram >1 µg/g em 22% de 74 amostras. O limite de detecção do método foi de 1 µg/g.

Danielsen & Funck Jensen (1998) avaliaram 35 amostras de milho proveniente de três regiões geográficas de Costa Rica, e detectaram fumonisinas em níveis de 4 a 16.000 ng/g, com uma média de 2500 ng/g, utilizando um cd-ELISA comercial baseado em anticorpos monoclonais (Ridascreen Fumonisin Fast, R-Biopharm). Os anticorpos apresentaram reatividade cruzada com FB₂ (40%) e FB₃ (100%), resultando em uma superestimação média de <20% para as leituras de FB₁. A recuperação desse ensaio foi de 60% e o limite de detecção de 3,4 ng/g.

Diversos estudos comparativos

de ELISAs competitivos com métodos químicos (CLAE, GC-MS) foram realizados, alguns apresentando boa correlação, embora o ELISA possa apresentar valores superestimados em determinados casos (Pestka et al., 1994; Sydenham et al., 1996a, b; Usleber et al., 1994; Iijima et al., 1996; Sutikno et al., 1996; Yu & Chu, 1996; Scott et al., 1997; Ono et al., 2000; Kim et al., 2002).

A performance de um ic-ELISA baseado em anticorpos monoclonais para detecção de fumonisinas foi avaliada em 150 amostras de milho recém-colhido (safras 1995 e 1996) de 3 regiões do Estado do Paraná (Ono et al., 2000, 2001). Fumonisinas foram detectadas em 147 (98%) amostras numa faixa de concentração de 0,096 a 22,6 µg/g. O ensaio apresentou um limite de detecção de 93 ng/g e coeficiente de correlação de 0,94 com a CLAE.

Kim et al. (2002) avaliaram a ocorrência de FB₁ em 76 amostras de derivados de milho (Seoul, Coreia) empregando dc-ELISA e CLAE. A recuperação média a partir de amostras de sucrilho artificialmente contaminadas em concentrações de 5-1000 ng/g FB₁ foram 104% por dc-ELISA (limite de detecção de 5 ng/g) e 82% por CLAE (limite de detecção de 20 ng/g), com boa correlação ($r^2 = 0,992$).

Um estudo colaborativo envolvendo 13 laboratórios no Estados Unidos foi realizado empregando dc-ELISA para determinação de fumonisinas totais (B₁, B₂, e B₃) em amostras de milho naturalmente contaminadas em três níveis e contaminadas artificialmente com 1,0, 3,0, e 5,0 mg/kg. A recuperação média de fumonisinas totais foi 120%, 100% e 90%, respectivamente, apresentando precisão intra e interlaboratorial aceitável (Bird et al., 2002).

Um novo sistema de imunensaio com lipossoma por injeção de fluxo denominado FILIA (*"Flow-injection liposome immunoanalysis"*) foi desenvolvido para a determinação quantitativa de FB₁. Este método utiliza lipossomas produzidos com FB₁ encapsulada com sulforodamina B, um corante. Esses lipossomas competem com a FB₁ presente na amostra por um número limitado de anticorpos imobilizados em uma coluna via pro-

teína A. A quantidade de lipossomas ligados aos anticorpos é inversamente proporcional à concentração de FB₁ livre presente na amostra injetada. O limite de detecção do FILIA é de 0,1 ng de FB₁ por 100 µL de amostra (Ho & Durst, 2000). Um estudo comparativo desse método com a CLAE apresentou um coeficiente de correlação de 0,945, indicando que o desempenho dos métodos são similares para a detecção de fumonisinas em milho, ração e outros alimentos. As principais vantagens do FILIA consistem em baixo limite de detecção, menor complexidade de execução e facilidade no preparo da amostra (Ho & Durst, 2003).

Maragos et al. (2001) desenvolveram um ensaio rápido baseado na polarização de fluorescência, onde ocorre competição entre fumonisina não marcada com fumonisina marcada fluorescentemente (FB₁-FL) pelo anticorpo monoclonal específico. A polarização de fluorescência da fumonisina marcada aumenta pela ligação com o anticorpo, portanto quando a toxina livre estiver presente, menos FB₁-FL será ligada, diminuindo o sinal da polarização. Este ensaio requer <2 min por amostra, apresentando um limite de detecção de 0,5 µg de FB₁/g em milho contaminado artificialmente e uma recuperação média de $94,3 \pm 13,8\%$ na faixa de 0,5-20 µg/g. A correlação com a CLAE foi de 0,85-0,88 (Maragos et al., 2001).

Castelo et al. (1998) determinaram as concentrações de fumonisinas em produtos derivados de milho, utilizando o dc-ELISA para fumonisinas totais (Veratox, Neogen) e a CLAE para FB₁. O limite de detecção para a CLAE foi de 75 ng de FB₁/g, enquanto que para o ELISA, o limite de detecção foi de 200 ng de fumonisina/g de alimento. A maioria das amostras apresentou concentrações maiores de fumonisinas quando analisadas por ELISA em relação à CLAE, sendo que estas diferenças podem ser ocasionadas pela presença de outras formas de fumonisinas reconhecidas por ELISA e não determinadas por CLAE e também pela presença de compostos adicionais, como precursores de fumonisinas ou metabólitos estruturalmente relacionados que reagem com os anticorpos do ELISA.

Torres et al. (1998) avaliaram a ocorrência de fumonisinas em 32 amostras de cerveja da Espanha, empregando cd-ELISA (Ridascreen, R-Biopharm). O limite de detecção do kit foi de 3 ng de fumonisinas/mL de cerveja. Das 32 amostras analisadas, 14 (43,8%) estavam contaminadas por fumonisinas com concentrações variando de 4,76 ng/mL a 85,53 ng/mL.

Outra variante de métodos imunquímicos consiste na detecção de fumonisinas por imunosensor de "surface plasmon resonance" (SPR). Neste método, anticorpos policlonais de alta afinidade específicos para FB₁ são imobilizados em uma película de ouro, que é acoplada a um prisma de vidro. Um raio de luz é focalizado através do prisma para excitar a SPR na película de ouro. Quando uma amostra contendo FB₁ é adicionada a uma célula na parte externa da película de ouro, o perfil angular da intensidade da luz refletida é alterado, provocando mudança no ângulo de ressonância que é proporcional à concentração de FB₁. O limite de detecção deste método é de 50 ng/mL com um tempo de análise inferior a 10 minutos (Mullett et al., 1998).

Os trabalhos relatados demonstraram que as técnicas imunquímicas preenchem os requisitos de rapidez e eficiência na triagem de micotoxinas, devendo-se concentrar os esforços na redução da reatividade cruzada.

Considerações finais

A ocorrência de micotoxinas como contaminantes alimentares, bem como o impacto desses compostos na saúde humana e animal, resultaram no desenvolvimento e no aperfeiçoamento de vários métodos de imunodetecção para monitorar os níveis de contaminação em alimentos. Atualmente existem kits de ELISA para análise das principais micotoxinas, porém as reações falso-positivas dificultam ainda, a sua utilização como alternativa aos métodos reconhecidos pela AOAC, sendo necessária a confirmação por métodos químicos como a CLAE. As colunas de imunoafinidade proporcionam especificidade e eficiência como técnica de pré-limpeza e concentração antes da análise por CLAE e têm

sido amplamente utilizadas na determinação de micotoxinas. Recentemente foram desenvolvidos métodos rápidos baseados em biosensores, "surface plasmon resonance", "dipstick", imuno-análise baseada em lipossoma, que podem ser utilizados na análise rápida de um grande número de amostras. Os imunoenaios desempenham um papel cada vez mais importante na análise de alimentos, principalmente de micotoxinas, pois disponibilizam uma gama de métodos que podem ser utilizados tanto nos laboratórios como ensaios quantitativos, como no campo, para a triagem. Considerando que os kits, bem como grande parte dos insumos para realização de imunoenaios são importados, elevando os custos, é de extrema importância alcançar a auto-suficiência na produção e desenvolvimentos de kits e reagentes imunológicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária.

Referências bibliográficas

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober, J.S. (2000) **Cellular and Molecular Immunology**. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Aldao M.A.J., Carpinella M.C., Corelli M., Herrero G.G. (1995). Competitive ELISA for quantifying small amounts of aflatoxin B₁, **Food and Agricultural Immunology** 7(4):307-314.

Ayres J.C. (1979). Significance of food mycology - an overview. In: **Food mycology**, Rhodes M.E. Ed., G.K. Hall & Co., Massachusetts, 3-10.

Azcona-Oliveira J. I., Abouzied M. M., Plattner R. D., Norred W. P., Pestka J.J. (1992a). Generation of antibodies reactive with fumonisins B₁, B₂ and B₃ by using cholera toxin as the carrier-adjuvant, **Applied and Environmental Microbiology** 58(1):169-173.

Azcona-Oliveira J. I., Abouzied M. M., Plattner R. D., Pestka J.J. (1992b). Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂ and B₃, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 40(3):531-534.

Barmark A. L., Larsson K. (1994). Immunoaffinity column clean-up/liquid chromatography determination of aflatoxins: An interlaboratory study, **Journal of AOAC International** 77:46-53.

Barna-Vetró I., Solti L., Téren J., Gyöngyösi A., Szabó E., Wölfling A. (1996). Sensitive ELISA Test for determination of ochratoxin A, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 44: 4071-4074.

Barna-Vetró I., Szabo E., Fazekas B., Solti L. (2000). Development of a sensitive ELISA for the determination of fumonisin B₁ in cereals, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48:2821-2825.

Beaver R.W., James M.A., Lin T.Y. (1991). Comparison of an ELISA-based screening test with liquid chromatography for the determination of aflatoxins in corn, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 74:827-829.

Bird C.B., Malone B., Rice L.G., Ross P.F., Eppley R., Abouzied M.M. (2002). Determination of total fumonisins in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study, **Journal of AOAC International** 85(2):404-410.

Bradburn N., Blunden G., Coker R.D., Jewers K. (1993). Aflatoxin contamination of maize, **Tropical Science** 33:418-428.

Burdaspal P., Ma Legarda T., Gilbert J. (2001). Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for the determination of ochratoxin A in baby food: collaborative study, **Journal of AOAC Inter-**

- national** 84:1445-1452.
- Carlson M.A., Barger C.B., Benson R.C., Fraser A.B., Phillips T.E., Velky J.T., Groopman J.D., Strickland P.T., Ko H.W. (2000). An automated, handheld biosensor for aflatoxin, **Biosensors and Bioelectronics** 14:841-848.
- Castelo M.M., Sumner, S.S., Bullerman L.B. (1998) Occurrence of fumonisins in corn-based food products, **Journal of Food Protection**, 61(6): 704-707.
- Christensen H.R., Yu F.-Y., Chu F.S. (2000). Development of a polyclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for fumonisin B₁, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48:1977-1984.
- Chu F.S. (1984). Immunoassays for analysis of mycotoxins, **Journal of Food Protection** 47: 562-569.
- Chu F.S., Fan T.S.L., Zhang G.S., Xu Y.C., Faust S., McMahon P.L. (1987). Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ in agricultural commodities, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 70:854-857.
- Chu F.S., Li G.Y. (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the Peoples' Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer, **Applied and Environmental Microbiology** 60:847-852.
- Daly S.J., Keating G.J., Dillon P.P., Manning B.M., O'Kennedy R., Lee H.A., Morgan M.R. (2000). Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B₁, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48(11):5097-5104.
- Danielsen S., Funck Jensen D. (1998). Relationships between seed germination, fumonisin content, and *Fusarium verticillioides* infection in selected maize samples from different regions of Costa Rica, **Plant Pathology** 47:609-614.
- De Saeger S., Van Peteghem C. (1996). Dipstick enzyme immunoassay to detect *Fusarium* T-2 toxin in wheat, **Applied and Environmental Microbiology** 62:1880-1884.
- Deshpande, S. S. (1996) Immunoassays Classification and Commercial Technologies. In: **Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development**, Chapman & Hall, New York, 231-259.
- Desjardins A.E., Manandhar G., Plattner R.D., Maragos C.M., Shrestha K., McCormick S.P. (2000). Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48:1377-1383.
- Devi K.T., Mayo M.A., Reddy K.L.N., Delfosse P., Reddy G., Reddy S.V., Reddy D.V.R. (1999). Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B₁, **Letters in Applied Microbiology** 29:284-288.
- Dorner J.W., Cole R.J. (1989). Comparison of two ELISA screening tests with liquid chromatography for determination of aflatoxins in raw peanuts, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 72(6):962-964.
- Dragacci S., Grosso F., Gilbert J. (2001). Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of aflatoxin M₁ in liquid milk: collaborative study, **Journal of AOAC International** 84:437-443.
- Entwistle A.C., Williams A.C., Mann P.J., Russel J., Slack P.T., Gilbert J. (2001). Combined phenyl silane and immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for the determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study, **Journal of AOAC International** 84:444-450.
- Fazekas B., Tar A. (2001). Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International** 84(5):1453-1459.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1997). Application of risk management to food safety matters. Report of the joint FAO/WHO consultation, FAO Food and Nutrition paper no. 65, Rome: FAO.
- Garden S.R., Strachan N.J.C. (2001). Novel colorimetric immunoassay for the detection of aflatoxin B₁, **Analytica Chimica Acta** 444:187-191.
- Gathumbi JK, Usleber E, Ngatia TA, Kangethe EK, Martlbauer E. (2003). Application of immunoaffinity chromatography and enzyme immunoassay in rapid detection of aflatoxin B₁ in chicken liver tissues, **Poultry Science** 82:585-590.
- Gazzaz S.S., Rasco B.A., Dong F.M. (1992). Application of immunochemical assays to food analysis, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 32(3):197-229.
- Gonzalez-Martinez M.A., Puchades R., Maquieira A. (1999). On-line immunoanalysis for environmental pollutants: from batch assays to automated sensors, **Trends in Analytical Chemistry** 18:204-218.
- Gremmels, J. F. (1999) Mycotoxins: Their Implications for Human and Animal Health. **The Veterinary Quarterly** 21(4):115-120.
- Harrison L.R., Colvin B.M., Green J.T., Newman L.E., Cole J.R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 2:217-221.

- Hefle S.L. (1995). Immunoassay fundamentals, **Food Technology** 49(2):102-107.
- Ho J.-A.A., Durst R.A. (2000). Development of a flow-injection liposome immunoanalysis system for fumonisin B₁, **Analytica Chimica Acta** 414:61-69.
- Ho J.-A.A., Durst R.A. (2003). Detection of fumonisin B₁: comparison of flow-injection liposome immunoanalysis with high-performance liquid chromatography, **Analytical Biochemistry** 312:7-13.
- Ho J.-A.A., Wauchope R.D. (2002). A strip liposome immunoassay for aflatoxin B₁, **Analytical Chemistry** 74:1493-1496.
- Hongyo K., Itoh Y., Hifumi E., Takeyasu A. (1992). Comparison of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay with thin-layer chromatography and liquid chromatography for aflatoxin B₁ determination in naturally contaminated corn and mixed feed, **Journal of AOAC International** 75:307-312.
- Iijima K., Kawamura O., Wang D.-S., Manabe M., Tanaka K., Chen G., Yu S.Z., Ueno W. (1996). Development of highly sensitive immunosorbent assay for fumonisins and its application for contaminated corn, **Mycotoxins** 42:63-66.
- International Agency for Research on Cancer. (2002) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and Their Supplements: A Complete List. Vol. 82, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*; International Agency for Research on Cancer, World Health Organization: Lyon, France, <http://monographs.iarc.fr/htdocs/monographs/vol82/82-05.html>.
- Kawamura O., Nagayama S., Sato S., Ohtani K., Ueno I., Ueno Y. (1988). A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ in peanut products, **Mycotoxin Research** 4:75-88.
- Kellerman T.S., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Gelderblom W.C.A., Cawood M., Coetzer J.A.W. (1990). Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁, **Onderstepoort Journal Veterinary Research** 57:269-275.
- Kim E.K., Shon D.H., Chung S.H., Kim Y.B. (2002). Survey for fumonisin B₁ in Korean corn-based food products, **Food Additives Contaminants** 19(5):459-464.
- Koeltzow D.E., Tanner S.N. (1990). Comparative evaluation of commercially available aflatoxin test methods, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 73:584-589.
- Kondo F., Ito Y., Yamada S., Tsuji K., Imokawa M., Niimi Y., Harada K.-I., Ueno Y., Miyazaki Y. (2002). Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column, **Toxicon** 40:893-899.
- Kulisek E.S., Hazebroek J.P. (2000). Comparison of extraction buffers for the detection of fumonisin B₁ in corn by immunoassay and high-performance liquid chromatography, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48:65-69.
- Lee, H. A.; Morgan, M. R. A. (1993) Food immunoassays: applications of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies. **Trends in Food Science and Technology** 4:129-134
- Li S., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Xiao H., Clarke J.R. (1994). The development of a quantitative ELISA for aflatoxin B₁ in ground peanuts using antibodies isolated from the yolk of a laying hen, **Journal of Food Protection** 57:1022-1024.
- Lipigorngoson S., Limtrakul P., Suttajit M., Yoshizawa T. (2003). In-house direct ELISA for determining aflatoxin B₁ in Thai corn and peanuts, **Food Additives Contaminants** 20 (9): 838-845.
- López, C. E.; Ramos, L. L.; Ramadán, S. S., Bulacio, L. C. (2003) Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. **Food Control**, 14: 31-34.
- Maragos C.M. (2002). Novel assays and sensor platforms for the detection of aflatoxins, **Advances in Experimental Medicine and Biology** 504:85-93.
- Maragos C.M., Jolley M.E., Plattner R.D., Nasir M.S. (2001). Fluorescence polarization as a means for determination of fumonisins in maize, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49:596-602.
- Morgan M.R.A., McNerney R., Chan H.W.S. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 66:1481-1484.
- Mortimer D.N., Shepherd M.J., Gilbert J., Clark C. (1988). Enzyme-linked immunosorbent (ELISA) determination of aflatoxin B₁ in peanut butter: collaborative trial, **Food Additives and Contaminants** 5:601-608.
- Mullett W., Lai E.P.C., Yeung J.M. (1998). Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor, **Analytical Biochemistry** 258:161-167
- Munkvold G.P., Desjardins A.E. (1997) Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? **Plant Disease** 81:556-565.
- Nasir M.S., Jolley M.E. (2002). Development of a fluorescence polarization assay for the determination of aflatoxins in grains, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50:3116-3121.

- Nilüfer D., Boyacioglu D. (2002). Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50(12):3375-3379.
- Oliveira M.S., Prado G., Junqueira R.G. (2000) Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 20(3):369-374.
- Ono E.Y.S., Kawamura O., Ono M.A., Ueno Y., Hirooka E.Y. (2000). A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil, **Food and Agricultural Immunology** 12(1):5-14.
- Ono E.Y.S., Ono M.A., Funo F.Y., Medina A.E., Oliveira T.C.R.M., Kawamura O., Ueno Y., Hirooka E.Y. (2001). Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA, **Food Additives and Contaminants** 18:719-729.
- Pal A., Dhar T.K. (2004). 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** 76:98-104.
- Park D.L., Miller B.M., Nesheim S., Trucksess M.W., Vekich A., Biggar B., McVey J.L., Brown L.H. (1989). Visual and semiquantitative spectrophotometric ELISA screening method for aflatoxin B₁ in corn and peanut products: follow-up collaborative study, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 72(4):638-643.
- Patey A.L., Sharman M., Gilbert J. (1991). Liquid chromatographic determination of aflatoxin levels in peanut butters using an immunoaffinity column cleanup method: international collaborative trial, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 74:76-81.
- Patey A.L., Sharman M., Gilbert J. (1992). Determination of total aflatoxin levels in peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study, **Journal of AOAC International** 75:693-697.
- Pestka J.J., Azcona-Oliveira J.I., Plattner R.D., Minervini F., Doko M.B., Visconti A. (1994). Comparative assessment of fumonisin in grain based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC, **Journal of Food Protection** 57(2):169-172.
- Pestka J.J., Abouzied M.N., Sutikno. (1995). Immunological assays for mycotoxin detection, **Food Technology** 2:120-128.
- Plattner R.D., Norred W.P., Bacon C.W., Voss K.A., Peterson R., Shackelford D.D., Weisleder D. (1990) A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Mycologia** 82: 698-702.
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S., Van Schalkwyk D.J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei, **Phytopathology** 82:353-357.
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Vismer H.F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species, **Applied and Environmental Microbiology** 68:2101-2105.
- Rustom, I.Y.S. (1997) Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry** 59(1):57-67.
- Sabino M., Milanes T.V., Lamardo L.C.A., Navas S.A., Stofer M., Garcia C.B. (1997) Avaliação da eficiência de dois kits comerciais para detecção de AFB₁ em amostras de milho, **ração e amendoim e seus produtos. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 17(2): 107-110.
- Sánchez, M. C. A. (1998) Testes Sorológicos. In: Abbas, A.K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. Revinter, Rio de Janeiro, 19-22.
- Scott P.M., Trucksess M.W. (1997). Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International** 80(5):941-949.
- Scott P.M., Yeung J.M., Lawrence G.A., Prelusky D.B. (1997). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of beer for fumonisins, **Food Additives and Contaminants** 14(5):445-450.
- Shephard G. S., Sydenham E.W., Thiel P.G., Gelderblom W.C.A. (1990) Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography** 13: 2077-2087.
- Sibanda L., De Saeger S., Van Peteghem C. (1999). Development of a portable field immunoassay for the detection of aflatoxin M₁ in milk, **International Journal of Food Microbiology** 48:203-209.
- Sibanda L., De Saeger S., Van Peteghem C., Grabarkiewicz-Szczesna J., Tomczak M. (2000). Detection of T-2 Toxin in different cereals by flow-through enzyme immunoassay with a simultaneous internal reference, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48:5864-5867.
- Souza S.V. C., Vargas E.A., Junqueira R.G. (1999) Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em leite e investigação da ocorrência no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 19(3):401-405.

- Stockenström S., Sydenham E.W., Thiel P.G. (1994) Determination of fumonisins in corn: Evaluation of two purification procedures. **Myco-toxin Research**, 10: 9-14.
- Stoloff, L. (1976) Occurrence of myco-toxins in foods and feeds. In: **Myco-toxins and other fungal related food problems**, Rodricks, J.V, American Chemical Society, Washington D.C., 23-50.
- Stroka J., Anklam E. (2002). New strategies for screening and determination of aflatoxins and for detection of aflatoxin producing mould in food and feed, **Trends in Analytical Chemistry**, 21:90-95.
- Sutikno, Abouzied M.M., Azcona-Olivera J.I., Hart L.P., Pestka J. (1996). Detection of fumonisins in *Fusarium* cultures, corn, and corn products by polyclonal antibody-based ELISA: relation to fumonisin B₁ detection by liquid chromatography, **Journal of Food Protection** 59(6):645-651.
- Sydenham E.W., Gelderblom W.C.A., Thiel P.G., Marasas W.F.O. (1990) Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 38(1): 285-290.
- Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Bird C., Miller B.M. (1996a). Determination of fumonisins in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 44(1):159-164.
- Sydenham E.W., Stockenström S., Thiel P.G., Rheeder J.P., Doko M.B., Bird C., Miller B.M. (1996b). Polyclonal antibody-based ELISA and HPLC methods for the determination of fumonisins in corn: a comparative study, **Journal of Food Protection** 59(8):893- 897.
- Thirumala-Devi K., Mayo M.A., Hall A.J., Craufurd P.Q., Wheeler T.R., Waliyar F., Subrahmanyam A., Reddy D.V.R. (2002). Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunoassay for aflatoxin M₁ in milk and milk-based confectionery, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50:933-937.
- Torres M. R., Sanchis V., Ramos A. J. (1998) Occurrence of fumonisins in spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **International Journal of Food Microbiology**, 39:139-143.
- Trucksess M.W., Stack M.E. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay of total aflatoxins B₁, B₂ and G₁ in corn: follow-up collaborative study, **Journal of AOAC International** 77(3):655-658.
- Trucksess M.W., Stack M.E., Nesheim S., Park D.L., Pohland A.E. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxins B₁, B₂, and G₁ in corn, cottonseed, peanuts, peanut butter, and poultry feed: collaborative study, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 72(6):957-962.
- Trucksess M.W., Stack M.E., Nesheim S., Page S.W., Albert R.H., Hansen T.J., Donahue K.F. (1991). Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts, and peanut butter: collaborative study, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 74(1):81-88.
- Trucksess M.W., Young K., Donahue K.F., Morris D.K., Lewis E. (1990). Comparison of two immunochemical methods with thin-layer chromatographic methods for determination of aflatoxins, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 73(3):425-428.
- Usleber E., Straka M., Terplan G. (1994). Enzyme immunoassay for fumonisin B₁ applied to corn-based food, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 42(6):1392-1396
- Valenta H. (1998). Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids, **Journal of Chromatography A**, 815:75-92.
- Visconti A., Boenke A. (1995). Improvement of the determination of fumonisins (FB₁ and FB₂) in maize and maize-based feeds, **European Commission BCR Information - Chemical Analysis**. Brussels, Belgium.
- Visconti A., Solfrizzo M., De Girolamo A. (2001). Determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn flakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity column clean-up: collaborative study, **Journal of AOAC International** 84(6):1828-1837.
- Watanabe E., Yosimura Y., Yuasa Y., Nakazawa, H. (2001). Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits, **Analytica Chimica Acta** 433:199-206.
- Wogan G.N. (1969) Metabolism and biochemical effects of aflatoxins. In: **Aflatoxin**, Goldblatt L.A. Academic Press Inc., London, 152-186.
- Yau K.Y.F., Lee H., Hall J.C. (2003). Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies, **Biotechnology Advances** 21:599-637.
- Yeung J.M., Prelusky D.B., Savard M.E., Dang B.D.M., Robinson L.A. (1996). Sensitive immunoassay for FB₁ in corn, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 44:3582-3586.
- Yu F.-Y., Chu F.S. (1996). Production and characterization of antibodies against fumonisin B₁, **Journal of Food Protection** 59:992-997. 