

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0620376-0 A2

(22) Data de Depósito: 13/12/2006
(43) Data da Publicação: 08/11/2011
(RPI 2131)



(51) Int.Cl.:
G01N 21/77
G01N 33/543
G01N 33/569

(54) Título: PROCESSO PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOTOXINAS, APARELHO PARA A REALIZAÇÃO DESTE, KIT PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOTOXINAS E APLICAÇÃO DO MESMO

(30) Prioridade Unionista: 23/12/2005 DE 10 2005 062 377.8

(73) Titular(es): BAYER CROPSCIENCE AG, Bayer Technology Services GMBH.

(72) Inventor(es): Ingmar Dorn, Isolde Häuser-Hahn, Jens Burmeister, Uwe Rabe

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006012000 de 13/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/079893 de 19/07/2007

(57) Resumo: PROCESSO PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE MICO-TOXINAS, APARELHO PARA A REALIZAÇÃO DESTE, KIT PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOTOXINAS E APLICAÇÃO DO MESMO. A invenção refere-se a um aparelho e a um processo para a detecção de micotoxinas e a kits adequados para a realização do processo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROCESSO PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOTOXINAS, APARELHO PARA A REALIZAÇÃO DESTE, KIT PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOTOXINAS E APLICAÇÃO DO MESMO".

5 A invenção refere-se a um aparelho e a um processo para a detecção de micotoxinas e a kits adequados para a realização do processo.

A detecção de micotoxinas compreende um grande campo de aplicação, por exemplo, nos setores de alimentos e de rações animais, em análise ambiental, em proteção de culturas e em pesquisa bioquímica.

10 Micotoxinas são toxinas produzidas por bolores, as quais têm estruturas químicas muito diferentes. Micotoxinas são encontradas em produtos colhidos, tais como grãos, frutas e sementes contendo óleo, e podem causar envenenamento de seres humanos e de animais. Mais de 300 micotoxinas diferentes foram identificadas até agora, as quais estão classificadas

15 em aproximadamente 25 tipos estruturais e exibem diferentes ações tóxicas. Dependendo do tipo de toxina, as micotoxinas podem provocar envenenamento agudo ou crônico. Grupos comuns de micotoxinas são aflatoxinas, ocratoxinas, alcalóides de cravagem do centeio, toxinas de patulina e *fusarium*. Particularmente importante entre as toxinas de *fusarium* são deoxiniva-

20 lenol, zearalenona, nivalenol, toxina T-2-/HT2 e as fumonisinas, porque elas são freqüentemente encontradas em produtos de cereais. Conseqüentemente, um ensaio para micotoxinas, por exemplo, para toxinas de fungos de campo, por exemplo, toxinas de *fusarium*, ou para toxinas de fungos de armazenamento, deve ser realizado em celeiros, nos negócios do comércio de

25 grãos e do processamento de grãos, por exemplo, moinhos, casas de malte, negócios de produção de rações animais, negócios agrícolas, centros de consultoria, universidades ou órgãos governamentais, por exemplo, o órgão para a proteção do consumidor, a fim de assegurar a qualidade dos alimentos.

30 Inúmeros processos para a detecção de micotoxinas têm sido reveladas na técnica anterior. Micotoxinas são detectadas, por exemplo, por processos cromatográficos, tais como HPLC, os quais podem ser acoplados

a detecção à base de fluorescência, absortiva ou de espectrometria de massa. Antes da análise de HPLC, por exemplo de uma amostra de grãos, o analito é usualmente concentrado e purificado por meio de colunas de imunoafinidade. Todos os processos à base de HPLC têm as desvantagens de grandes dispêndios em capital, manejo de amostras relativamente complexo e análises prolongadas. Devido às mencionadas desvantagens, processos de detecção à base de HPLC não são adequados para análise rápida, econômica e simples, por exemplo, de amostras de grãos nos negócios de produção, aceitação, comércio ou processamento de grãos. Análise à base de HPLC é realizada ao invés de laboratórios analíticos especializados. Consequentemente, na prática, o resultado está disponível somente depois de uma demora de vários dias.

Um método alternativo de detecção de micotoxinas é a tecnologia ELISA (ensaio imunossorbente ligado à enzima). A ELISA é fornecida com placas de microtitulação, cujas cavidades estão revestidas, por exemplo, com anticorpos de captura que se ligam de maneira específica a uma micotoxina. As desvantagens da ELISA são as muitas etapas de pipetagem, lavagem e incubação, que podem resultar em análises relativamente longas de mais de 30 minutos. Isso impede que o teste seja realizado de maneira rápida no ponto do lado de fora de um laboratório analítico. Além disso, o ensaio não permite a detecção simultânea de múltiplos analitos, uma vez que cada placa de microtitulação está usualmente revestida com somente um tipo de anticorpos.

Outro método de detecção de micotoxinas são os ensaios de escoamento lateral (EELs). As micotoxinas podem ser detectadas por meio de EEL, por exemplo, por realização de um imunoensaio competitivo direto em uma fita de nitrocelulose, com a amostra a ser analisada, devido às forças de capilaridade. De maneira desvantajosa, o processo permite somente a detecção de micotoxinas qualitativa. Outra desvantagem desse ensaio é a necessidade de uma fita separada para cada micotoxina.

A técnica anterior também inclui estudos sobre o desenvolvimento de processos para a detecção de micotoxinas, por exemplo, descritos por

M. M. Ngundi et al., Anal. Chem. 2005, 77, 148-154. Esse processo comprende a realização de imunoensaio competitivo indireto para a detecção de ocratoxina A, por imobilização de ocratoxina A em lâminas de vidro. A mistura de um anticorpo marcado de maneira fluorescente com relação à ocratoxina A e da amostra a ser determinada é aplicada à lâmina, que pode ser lida depois que os anticorpos não ligados tiverem sido removidos por lavagem. De maneira desvantajosa, esse processo exige etapas de lavagem e tempos de incubação de desde cerca de 10 a 20 minutos e também complicados sistemas de formação de imagens por fluorescência para a leitura dos resultados. Como um resultado, não é possível desenvolver um ensaio rápido nesta base, que possa ser realizado no ponto do lado de fora de um laboratório analítico.

Os processos conhecidos na técnica anterior, para a detecção de micotoxinas, portanto, exigem grande dispêndio de capital devido à complicada aparelhagem de leitura, incluem muitas etapas manuais ou não podem ser usados do lado de fora de um laboratório analítico.

O objetivo da presente invenção é, portanto, fornecer um processo que supere pelo menos uma das desvantagens mencionadas acima da técnica anterior, em particular um processo que permita que as micotoxinas a serem detectadas em uma amostra, de uma maneira rápida, econômica e fácil de realizar.

Esse objeto é alcançado por um processo para a detecção rápida de micotoxinas, compreendendo as seguintes etapas:

a) fornecimento de uma guia de onda de filme fino compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente no topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a), à cuja guia de onda são imobilizados componentes de ligação específicos e/ou por afinidade como um elemento de reconhecimento químico ou bioquímico para micotoxinas e/ou um componente de ligação de uma maneira separada espacialmente,

b) aplicação de uma amostra contendo micotoxina(s) e componentes de ligação aos componentes de ligação imobilizados sobre a guia de

onda de filme fino,

c) detecção de um sinal no campo evanescente devido à interação dos componentes de ligação imobilizado sobre a guia de onda de filme fino com as micotoxinas a partir da amostra e/ou com os componentes de ligação,

d) determinação da quantidade de micotoxina(s) presente(s) na amostra.

A presente invenção refere-se adicionalmente a um aparelho para a realização do processo para a detecção de micotoxinas.

Uma matéria objeto adicional é um kit adequado para a realização do processo para a detecção de micotoxinas.

Outras concretizações vantajosas da invenção surgem das reivindicações dependentes.

De maneira surpreendente, constatou-se que o processo de acordo com a invenção, para a detecção de micotoxinas, pode ser realizado prontamente e do lado de fora de laboratórios analíticos especializados. Isso permite que o processo de acordo com a invenção seja realizado por meio de um ensaio rápido, sem, necessariamente, o manejo sobre as amostras para um laboratório para análise. Além disso, a detecção de micotoxina, de acordo com o processo de acordo com a invenção, de maneira vantajosa exige somente umas poucas, se houver, etapas de lavagem. Isso é particularmente vantajoso pelo fato de que a realização das etapas de lavagem é consumidora de tempo, prolonga o tempo até que um resultado da análise seja obtido, e pode distorcer os resultados da análise ou mesmo tornar a detecção completamente impossível, em particular, quando a última for realizada com pouco cuidado ou de maneira não apropriada.

A combinação das propriedades vantajosas do processo de acordo com a invenção permite que as micotoxinas sejam detectadas em itens de alimentos, por exemplo, em celeiros, em negócios de comércio de grãos ou de processamento de grãos. Em particular, o processo pode ser realizado facilmente e rapidamente e isto permite que mesmo indivíduos, que não sejam analistas especializados de um laboratório especialista, reali-

zem o processo.

Concretizações preferidas do processo fazem uso de uma guia de onda de filme fino na forma de um biochip de campo evanescente sobre uma guia de onda de filme fino, de preferência, um biochip de guia de onda óptico planar, baseado em uma guia de onda de filme fino.

5 Guias de onda são uma classe de transdutores de sinal, que podem ser usados para a detecção da mudança nas propriedades ópticas de uma margem do meio de uma camada de guia de onda, tipicamente um dieletrico. Quando a luz é transportada em modo guiado dentro da camada de 10 guia de onda, o campo de luz não diminui de maneira abrupta na interface meio / guia de onda, mas, ao invés disto, decai exponencialmente no meio de detecção adjacente à guia de onda. A esse campo de luz com decaimento de maneira exponencial se refere como campo evanescente. Uma mudança nas propriedades ópticas da margem do meio da guia de onda, dentro 15 do campo evanescente, pode ser detectada usando um ajuste de medição adequado.

O uso de guias de onda como transdutores de sinal é vantajoso pelo fato de que, no caso de elementos de reconhecimento imobilizados na interface de guia de onda, a ligação a ou a reação do elemento de reconhecimento 20 podem ser detectados, quando as propriedades ópticas da mudança do meio de detecção na interface com a guia de onda.

Conseqüentemente, é possível tanto economizar tempo e simplificar o procedimento quando da realização da detecção.

Portanto, um sinal ou um elemento marcado pode ser detectado 25 por meio da mudança de propriedades ópticas do meio, por exemplo, de uma amostra a ser analisada, diretamente sobre a superfície do transdutor de sinal ou guia de onda de filme fino, por exemplo, por meio de uma mudança em absorbância, fluorescência, fosforescência, luminescência ou similares.

30 Preferência é dada para se detectar um sinal de fluorescência no campo evanescente. Elementos de marcação, que podem ser usados de acordo com a invenção para a marcação dos componentes de ligação, por

exemplo, micotoxinas, conjugados com micotoxinas, conjugados com anticorpos ou anticorpos, são, de preferência, fluoróforos orgânicos, nanopartículas, nanopartículas fluorescentes, contas, contas fluorescentes, proteínas fluorescentes ou outras moléculas ou unidades de sinalização ou quaisquer 5 combinações de vários elementos de marcação. Preferência é dada a se usar componentes de ligação, que tenham sido ligados de uma maneira capaz de luminescência. Elementos de marcação preferidos são fluoróforos orgânicos e/ou proteínas fluorescentes.

De acordo com o processo de acordo com a invenção, o componente de ligação marcado fluorescente de maneira preferida pode ser excitado por um campo evanescente. Em concretizações preferidas, o campo evanescente é gerado por uma guia de onda óptica planar, conforme descrito na Patente Norte-americana de número 5.959.292, Duveneck et al. Fluorescência emitida isotropicamente pode ser detectada usando-se um ajuste 10 adequado. Em outras concretizações, fluorescência acoplada à guia de onda pode ser acoplada fora da guia de onda novamente por um elemento óptico 15 adequado e ser detectada usando-se um ajuste óptico adequado.

De maneira especialmente vantajosa, a remoção por lavagem de componentes de ligação marcados fluorescentemente de maneira preferida 20 ou de uma amostra ou solução contendo componentes de ligação marcados, antes da detecção de um sinal, pode ser restrita ou mesmo pode ser completamente dispensada. Isso permite que as micotoxinas sejam detectadas em menos tempo, assim como de uma maneira simplificada, uma vez que o fornecimento das várias soluções de tampão do protocolo de lavagem, que 25 são normalmente usados também pode ser dispensado.

Guias de onda de filme fino utilizáveis compreendem uma camada (a) de guia de onda opticamente transparente compreendendo óxidos selecionados a partir do grupo consistindo em TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 e/ou ZrO_2 , de preferência, selecionados a partir do grupo consistindo 30 em TiO_2 , Ta_2O_5 e/ou Nb_2O_5 . De preferência, a camada (a) de guia de onda opticamente transparente é feita de TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 ou ZrO_2 , de preferência, TiO_2 , Ta_2O_5 ou Nb_2O_5 . O uso de pentóxido de tântalo se

mostrou especialmente vantajoso, em particular para detecção de um sinal de fluorescência.

Concretizações particulares compreendem a aplicação à guia de onda de filme fino, em particular à camada (a) de guia de onda opticamente transparente, compreendendo óxidos selecionados a partir do grupo compreendendo TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 e/ou ZrO_2 , de mono- ou multi-camadas de ácidos organofosfóricos da seguinte fórmula (I)



e/ou de ácidos organofosfônicos da seguinte fórmula (II)



e/ou de seus sais, sendo que

R é um grupo C_{10} a C_{24} alquila.

Utilizáveis de preferência são ácidos organofosfóricos e/ou ácidos organofosfônicos, de preferência, organofosfatos e/ou organofosfonatos,

com R sendo selecionado a partir do grupo compreendendo C_{10} a C_{20} alquila não ramificada, de preferência, selecionado a partir do grupo compreendendo C_{12} a C_{18} alquila não ramificada, de preferência, selecionado a partir do grupo compreendendo ácido dodecilfosfórico, dodecilfosfato, octadecilfosfato e/ou ácido octadecilfosfônico.

Utilizáveis de preferência são ácidos organofosfóricos ou organofosfatos, que podem ser aplicados à guia de onda de filme fino por meio de sais solúveis em água a partir de solução aquosa.

Em concretizações preferidas, os ácidos organofosfóricos e/ou ácidos organofosfônicos, de preferência, organofosfatos, são aplicados por meio de uma monocamada à guia de onda de filme fino, em particular um biochip de campo evanescente, de preferência, um biochip de guia de onda ótica planar. Eles podem ser aplicados por meio de processos de imersão.

A monocamada pode ser aplicada como uma camada promotora de adesão à camada opticamente transparente, feita de óxidos. Vantajosamente, ácidos organofosfóricos e/ou ácidos organofosfônicos podem interagir com elementos de reconhecimento, em particular com proteínas ou elementos de reconhecimento acoplados a proteínas, e intensificar a ligação

dos elementos de reconhecimento ao biochip.

Componentes de ligação utilizáveis são, de preferência, selecionados a partir do grupo consistindo em anticorpos antimicotoxina, conjugados de antimicotoxina - anticorpo, micotoxinas, conjugados de micotoxina, 5 fragmentos de anticorpos antimicotoxina, peptídeos de ligação à micotoxina, anticalinas de ligação à micotoxina, aptâmeros de ligação à micotoxina, espelhômeros de ligação à micotoxina e/ou polímeros impressos de ligação à micotoxina, de preferência, selecionados a partir do grupo compreendendo anticorpos antimicotoxina, conjugados antimicotoxina - anticorpo, micotoxinas e/ou conjugados de micotoxina. 10

Os componentes de ligação interagem, em cada caso, especificamente com e/ou com afinidade ao, em cada caso, outro componente de ligação. Por exemplo, anticorpos antimicotoxina, que são aplicados à guia de onda de camada fina, se ligam com afinidade às micotoxinas imobilizadas na 15 guia de onda de filme fino. Igualmente, anticorpos antimicotoxina, imobilizados sobre uma guia de onda de filme fino, se ligam com afinidade às micotoxinas ou conjugados de micotoxina, que são aplicados à guia de onda de filme fino. A especificidade de ligação, aqui, depende dos componentes de afinidade usados. Portanto, anticorpos antimicotoxina reativos de maneira 20 cruzada utilizáveis se ligam com afinidade às micotoxinas correspondentes, por exemplo, do grupo de fumosinas, mas, menos especificamente do que, por exemplo, um anticorpo especial à fumosina B1 o seria. A componentes de ligação, que estejam imobilizados, também se refere como elemento de reconhecimento ou "moléculas de captura".

25 Conjugados de antimicotoxina - anticorpo e conjugados de micotoxina podem ser formados, por exemplo, a partir de uma proteína e de anticorpos antimicotoxina ou micotoxina.

Em concretizações preferidas, por exemplo, em ensaios indiretamente competitivos, os componentes de ligação imobilizados são conjugados de micotoxina. Conjugados de micotoxina podem ser formados, de preferência, a partir de micotoxina ligada a proteínas, por exemplo, albumina de soro bovino (ASB). Uma vantagem especial de se usar um tal conjugado de

micotoxina-ASB é o fato de que a ligação da micotoxina à guia de onda de filme fino pode ser intensificada por uma interação entre a proteína e os ácidos organofosfóricos e/ou os ácidos organofosfônicos. Isso pode aperfeiçoar a adesão dos elementos de reconhecimento à guia de onda de filme fino.

5 Um elemento de marcação, por exemplo, um corante fluorescente ou fluoróforo, pode estar ligado diretamente a um componente de ligação, por exemplo, a um anticorpo antimicotoxina ou uma micotoxina, ou via um elemento espaçador, por exemplo, uma proteína ou uma cadeia de alquila ou cadeia de polietileno glicol. O elemento de marcação, por exemplo, um
10 corante fluorescente ou fluoróforo, de preferência, está ligado às micotoxinas via uma proteína. Um exemplo de uma proteína adequada é ASB. A ligação de um fluoróforo a uma micotoxina por meio de ASB pode aperfeiçoar, de maneira nítida, a ligação do elemento de marcação aos componentes de ligação, por exemplo, anticorpos. Sendo capaz de evitar processos complicados para a ligação, por exemplo, de um fluoróforo, a uma micotoxina de maneira direta, constitui outra vantagem. Componentes de ligação preferidos para um anticorpo antimicotoxina imobilizado, que pode ser usado em um ensaio competitivo direto, por exemplo, são conjugados micotoxina-ASB marcados de maneira fluorescente.

20 Em princípio, micotoxinas podem ser detectadas em amostras, soluções ou outros meios, todos os quais são capazes de ser aplicados a uma guia de onda de filme fino. Em concretizações preferidas, as amostras são alimento para seres humanos ou para animais. Micotoxinas são detectadas, de preferência, de acordo com o processo de acordo com a invenção
25 em cereais, produtos de cereais, vinho, sucos ou frutas e/ou em produtos contendo cereais, vinho, sucos e/ou frutas. A amostra a ser analisada, por exemplo, um item ou produto alimentício, pode, aqui, ser aplicado à guia de onda de filme fino ou extraído com um solvente ou mistura de solventes, com o extrato extraído sendo usado. O extrato pode ser utilizável em forma
30 diluída ou concentrada.

As micotoxinas podem ser removidas a partir da amostra a ser estudada, por exemplo, cereais ou outros ítems alimentícios, por tratamento

com um solvente ou mistura de solventes. Por exemplo, micotoxinas podem ser removidas a partir de amostras de grãos por moagem e subsequente extração com água ou solventes orgânicos ou misturas de solventes, por exemplo, com misturas de água, a qual pode ser adicionada sob mistura 5 com substâncias de tampão, sais, ácidos ou bases e outros aditivos, e solventes orgânicos, por exemplo, com misturas de água e metanol ou etanol ou de água e acetonitrila. Outros processos de extração de micotoxinas são conhecidos do trabalhador especializado. As micotoxinas dissolvidas obtidas podem, então, ser analisadas ou diretamente ou depois de diluição ou concentração na guia de onda de filme fino ou chip.

10 Elementos de reconhecimento utilizáveis, a que se refere como "moléculas de captura", de preferência, selecionados a partir do grupo compreendendo anticorpos antimicotoxina, anticorpos, conjugados antimicotoxina-anticorpo, micotoxinas e/ou conjugados de micotoxina, de preferência, 15 dois ou mais destes diferentes, podem ser imobilizados de maneira covalente ou não covalente, por exemplo, por adsorção hidrofóbica, sobre a superfície de guia de onda de filme fino ou sobre a superfície do chip. Eles podem ser imobilizados, por exemplo, por aplicação dos elementos de reconhecimento por meio de campos de medição, chamados pontos, à superfície de 20 guia de onda de filme fino ou à superfície do chip, um processo a que se refere também como aplicação de pontos. Preferência é dada à solução de aplicação de pontos, de preferência, soluções tampão contendo o(s) componente(s) de ligação como elemento de reconhecimento, usando-se dispositivos para aplicação automática, chamados de ponteadores. Preferência é 25 dada à incubação das guias de onda de filme fino ou chips depois da aplicação de pontos durante pelo menos uma hora, de preferência, algumas horas, de modo a permitir que os elemento de reconhecimento se liguem à guia de onda de filme fino ou ao chip.

30 Preferência é dada ao tratamento dos biochips, depois da aplicação de pontos, com uma solução de proteína, de preferência, uma solução de uma proteína de bloqueio utilizável, por exemplo, ASB, durante pelo menos uma hora, de preferência, 2 horas a 6 horas, especialmente, de prefe-

rência, 3 horas a 4 horas. Depois da remoção da solução, as guias de onda de filme fino ou biochips podem ser secados e armazenados.

A amostra e o componente de ligação marcado de preferência de maneira fluorescente pode ser aplicado aos elementos de reconhecimento imobilizados sobre a guia de onda de filme fino, de preferência, biochip de campo evanescente, de preferência, um biochip de guia de onda óptica planar, simultaneamente ou sucessivamente. Portanto, é possível adicionar componentes de ligação marcados de preferência de maneira fluorescente, por exemplo, uma ou mais micotoxinas marcadas de preferência de maneira fluorescente, conjugados de micotoxina ou anticorpos, a uma ou mais micotoxinas, antes da ou durante a incubação de uma amostra, por exemplo, um extrato, sobre o chip. Também é possível, por exemplo, aplicar ao chip um extrato de uma amostra a ser analisada em uma mistura com micotoxinas, conjugados de micotoxina ou anticorpos, de preferência, marcados, de preferência marcados de maneira fluorescente, a uma ou mais micotoxinas.

De maneira especialmente vantajosa, a amostra pode ser incubada de acordo com o processo de acordo com a invenção com os componentes de ligação imobilizados, como elemento de reconhecimento químico ou bioquímico, sobre a guia de onda de filme fino e/ou os componentes de ligação, menos do que 15 minutos, de preferência, menos do que 10 minutos, especialmente de preferência, menos do que 5 minutos, antes da detecção do sinal.

Isso é grandemente vantajoso em relação aos processos conhecidos, os quais exigem tempos de incubação, com conjugado de micotoxina aplicados com uma solução de anticorpos de micotoxina marcados, algumas vezes de até duas horas, ou em relação a processos que exigem que as amostras sejam pré-incubadas com anticorpos antimicotoxina marcados. Isso permite que as micotoxinas sejam determinadas muito mais rapidamente pelo processo de acordo com a invenção do que por processos conhecidos. Mais especificamente, o tempo de incubação pode ser encurtado de maneira considerável. Em concretizações especialmente preferidas, o tempo de incubação pode ser menor do que 10 minutos ou mesmo de somente 5

minutos. Em particular, em combinação com a vantagem adicional de ser capaz de dispensar etapas de lavagem, isso permite que o processo de acordo com a invenção produza um resultado em menos de 20 minutos, de preferência, em menos do que 15, especialmente de preferência, em menos de 10 minutos.

Usando-se o processo de acordo com a invenção, micotoxinas podem ser determinadas quantitativamente e, de preferência, com pouca variação. Por exemplo, o "coeficiente de variação interlaboratorial", uma medida da reproducibilidade, pode ser menor do que 50%, de preferência, menor do que 40%. Além disso, o "coeficiente de variação interlaboratorial", uma medida da reproducibilidade, pode ser menor do que 20%. Isso permite que o processo de acordo com a invenção seja usado dentro do contexto de um processo padronizado e simples para a determinação de micotoxinas em ítems alimentícios, por exemplo, cereais, produtos de cereais e vinhos.

15 Micotoxinas detectáveis são selecionadas, de preferência, a partir do grupo compreendendo aflatoxinas, ocratoxinas, alcalóides de cravagem do centeio, patulina e/ou toxinas de *fusarium*, por exemplo, selecionadas a partir do grupo compreendendo deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, ocratoxina A e/ou fumonisinas. Fumonisinas são 20 selecionadas, de preferência, a partir do grupo compreendendo fumonisina B1, fumonisina B2 e/ou fumonisina B3.

Conseqüentemente, componentes de ligação utilizáveis são selecionados, de preferência, a partir do grupo de micotoxinas compreendendo aflatoxinas, ocratoxinas, alcalóides de cravagem do centeio, patulina e/ou toxinas de *fusarium*, por exemplo, selecionadas a partir do grupo consistindo em deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, ocratoxina A e/ou fumonisinas, e anticorpos com relação a micotoxinas selecionados a partir do grupo compreendendo aflatoxinas, ocratoxinas, alcalóides de cravagem de centeio, patulina e/ou toxinas de *fusarium*, por exemplo, selecionadas a partir do grupo compreendendo deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2 e/ou fumonisinas.

Dependendo do tipo de imunoensaio usado, um dos componen-

tes de ligação, por exemplo, um ou mais das micotoxinas, no caso de um imunoensaio indiretamente competitivo, está immobilizado como elemento de reconhecimento na guia de onda de filme fino, enquanto que o outro componente de ligação, por exemplo, um ou mais dos anticorpos antimicotoxina, no 5 caso de um imunoensaio indiretamente competitivo, é aplicado à guia de onda de filme fino antes ou simultaneamente com a amostra. O componente de ligação a ser adicionado aqui está marcado, de preferência, de maneira luminescente, de preferência, com um fluoróforo.

Componentes de ligação utilizáveis são, de preferência, selecionados a partir do grupo compreendendo deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, ocratoxina A e/ou fumonisina B1, fumonisina B2 e/ou fumonisina B3, e anticorpos com relação a micotoxinas selecionadas a partir do grupo compreendendo deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, ocratoxina A e/ou fumonisina B1, fumonisina B2 e/ou 15 fumonisina B3.

De preferência, anticorpos monoclonais para micotoxina, por exemplo, antifumosina B1, antifumosina B2 ou antifumosina B3, podem ser aqui usados. Anticorpos agindo contra o grupo de fumosinas também podem ser usados. Componentes de ligação úteis, de preferência, anticorpos para 20 micotoxinas, podem ser usados individualmente ou em uma mistura, e, além disso, é possível usar anticorpos reativos de maneira cruzada.

Uma vantagem particular do processo de acordo com a invenção decorre do fato de que o processo de acordo com a invenção pode detectar micotoxinas com sensibilidade aumentada. Por exemplo, micotoxinas podem 25 ser detectáveis mesmo na faixa de concentrações de micotoxinas nanomolares ou picomolares, em particular, em itens alimentícios para seres humanos e animais, por exemplo, cereais, vinho, sucos, frutas e/ou seus produtos, ou em extratos dos itens ou produtos alimentícios. Por exemplo, micotoxinas podem ser detectáveis em extrato de cereal, mesmo na faixa de micotoxina desde 0,1 pM 30 a 100 nM, de preferência, na faixa de micotoxina desde 1 pM a 1 nM, de preferência, menos do que micotoxina 100 pM, de preferência, menos do que micotoxina 10 pM, especialmente de preferência, menos do

que micotoxina 1 pM, podem ser detectáveis.

Além disso, micotoxinas podem ser detectáveis em extrato cere-
al na faixa desde 10^{-4} ppb a 10.000 ppb de micotoxina, em cereais na faixa
desde 10^{-2} ppb a 10.000 ppb de micotoxina. De preferência, micotoxinas po-

5 dem ser detectáveis em extrato de cereal na faixa de $\leq 0,1$ ppb de micotoxi-
na, de preferência, na faixa de $\leq 0,01$ ppb de micotoxina, especialmente de
preferência, na faixa de $\leq 10^{-4}$ ppb de micotoxina, em cereais, na faixa de \leq
0,1 ppb de micotoxina, de preferência, na faixa de $\leq 0,01$ ppb de micotoxina,
especialmente de preferência, na faixa de $\leq 10^{-4}$ ppb de micotoxina.

10 Isso permite que as micotoxinas presentes em ítems alimentícios
sejam determinadas mais acuradamente do lado de fora de um laboratório
analítico do que previamente possível.

15 O processo de acordo com a invenção permite que pelo menos
duas micotoxinas, de preferência, desde 2 a 1.000 micotoxinas, de preferên-
cia, desde 5 a 100 micotoxinas, sejam detectáveis. Mais especificamente, é
possível determinar micotoxinas de maneira simultânea. Isso é uma grande
vantagem em relação aos processos conhecidos, a maioria dos quais permi-
te meramente uma única micotoxina seja detectada de cada vez.

Uma concretização preferida do processo para a detecção de
20 micotoxinas prevê a imobilização de componentes de ligação específicos
e/ou por afinidade, como elemento de reconhecimento químico ou bioquími-
co para micotoxinas e/ou um componente de ligação de uma maneira espa-
cialmente separada, sobre a superfície de uma guia de onda de filme fino
compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente
25 transparente no topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente,
com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a). A amostra a ser
analisada e os componentes de ligação de preferência marcados com fluoró-
foro podem, então, ser adicionados de maneira simultânea ou sucessiva. A
30 interação específica e/ou por afinidade entre os componentes de ligação i-
mobilizados sobre a guia de onda de filme fino, a(s) micotoxina(s) da amos-
tra e/ou os componentes de ligação de preferência marcados com fluoróforo
podem ser detectados como uma mudança de sinal no campo evanescente.

A presença de uma micotoxina na amostra produz uma mudança do sinal no campo evanescente.

De acordo com a invenção, as micotoxinas podem ser detectadas por um ensaio, por exemplo, um imunoensaio, sobre o chip. A detecção das micotoxinas é, de preferência, realizada por meio de um imunoensaio, de preferência, um imunoensaio competitivo, por exemplo, um imunoensaio diretamente ou indiretamente competitivo, especialmente de preferência, por meio de um imunoensaio indiretamente competitivo.

Uma concretização preferida do processo para detecção de micotoxinas, por meio de um imunoensaio diretamente competitivo, pode prever imobilização de anticorpos antitoxina como um elemento de reconhecimento químico ou bioquímico para micotoxinas, de uma maneira espacialmente separada, sobre a superfície de uma guia de onda de filme fino compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente no topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a). De preferência, micotoxinas marcadas com fluoróforo ou conjugados de micotoxina-ASB de preferência marcados com fluoróforo podem, então, ser adicionados de maneira simultânea com ou antes da amostra a ser analisada. A interação entre os anticorpos antimicotoxina imobilizados sobre a guia de onda de filme fino, a(s) micotoxina(s) da amostra e/ou as micotoxinas ou conjugados de micotoxina-ASB, de preferência marcados com fluoróforo, podem ser detectados como uma mudança de sinal no campo evanescente.

No caso de um imunoensaio competitivo direto, de preferência, dois ou mais anticorpos antimicotoxina diferentes podem ser imobilizados, sobre a superfície do chip, de maneira covalente ou não covalente, por exemplo, por aplicação de pontos. A aplicação de, por exemplo, um extrato de uma amostra de ser estudada em uma mistura com micotoxinas ou conjugados de micotoxina, de preferência marcados de maneira fluorescente, ao chip resulta nas micotoxinas ou nos conjugados de micotoxina não marcados competindo pelos sítios de ligação a anticorpo disponíveis no chip. As micotoxinas marcadas de maneira fluorescente podem ser adicionadas an-

tes da ou durante a incubação do extrato sobre o chip. A quantidade das micotoxinas marcadas, ligadas ao anticorpos imobilizados, é inversamente proporcional à quantidade de micotoxinas presentes no extrato.

A detecção também pode ser conduzida por meio de um ensaio 5 em sanduíche. Nesse caso, anticorpos de detecção marcados, que se ligam a um complexo imobilizado de anticorpos imobilizados no chip e micotoxinas são usadas ao invés de micotoxinas ou conjugados de micotoxina marcados. Em um ensaio intercalado, a quantidade de fluoróforos ligados aos anticorpos é proporcional à concentração de micotoxinas no extrato.

10 Outra concretização preferida do processo para detecção de micotoxinas por meio de um imunoensaio indiretamente competitivo pode prever a imobilização de micotoxinas ou, de preferência, conjugados de micotoxina - ASB de preferência marcados com fluoróforo, como um elemento de reconhecimento químico ou bioquímico, de uma maneira espacialmente separada sobre a superfície de uma guia de onda de filme fino compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente sobre o topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a). De preferência, anticorpos antimicotoxina de preferência marcados com fluoróforo podem, então, ser adicionados simultaneamente com a ou antes da amostra a ser analisada. A interação entre as micotoxinas ou conjugados de micotoxina - ASB de preferência marcados com fluoróforo imobilizados sobre a guia de onda de filme fino, a(s) micotoxina(s) da amostra e/ou os anticorpos antimicotoxina de preferência marcados com fluoróforo podem ser detectados como uma mudança 15 de sinal no campo evanescente.

20

25

De acordo com a invenção, micotoxinas também podem ser detectadas por um imunoensaio competitivo indireto. Nesse caso, micotoxinas ou conjugados de micotoxina, por exemplo, conjugados de micotoxina - proteína, de preferência, conjugados de micotoxina - ASB, podem ser imobilizados sobre o chip. A aplicação de um extrato de uma amostra a ser estudada, em uma mistura com anticorpos antimicotoxina de preferência marcados de maneira fluorescente, ao chip resulta nas micotoxinas imobilizadas e nas

micotoxinas em solução competindo pelos sítios de ligação disponíveis dos anticorpos marcados de maneira fluorescente. Os anticorpos antimicotoxina marcados de maneira fluorescente podem ser adicionados antes da ou durante a incubação do extrato sobre o chip. Nesse caso, a quantidade de anticorpos marcados ligados é inversamente proporcional à quantidade de micotoxinas presentes no extrato.

Além disso, o sinal pode ser detectado, de maneira vantajosa, no campo evanescente por meio de um dispositivo de leitura. O dispositivo de leitura pode ser, por exemplo, um dispositivo de leitura robusto e econômico.

Programa de computador adequado pode ser usado para a avaliação da intensidade do sinal, por exemplo, intensidade de fluorescência, assim como para o cálculo da quantidade de micotoxinas presentes na amostra.

As vantagens fornecidas pelo processo de acordo com a invenção, em particular uma combinação de um processo que é fácil de realizar, a possibilidade de ser capaz de detectar uma pluralidade de micotoxinas de simultaneamente e quantitativamente em um dispositivo de leitura robusto e econômico, permitem que as micotoxinas sejam detectadas facilmente e rapidamente do lado de fora de um laboratório analítico.

Além disso, a invenção se refere a um aparelho para a realização do processo para a detecção de micotoxinas.

O aparelho para a realização do processo para a detecção de micotoxinas tem uma guia de onda de filme fino, de preferência, um biochip de guia de onda óptica planar com base em uma guia de onda de filme fino compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente no topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a). Os elementos de reconhecimento estão, de preferência, imobilizados na camada (a).

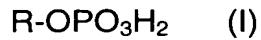
Exemplos de guias de onda ópticas planares adequadas são descritas no documento de número WO/92870 ou na Patente Norte-americana de número 5.959.292.

Em concretizações preferidas do dispositivo, a camada (b) opticamente transparente da guia de onda de filme fino, de preferência, biochip de guia de onda óptica planar, pode ser feita de silicatos, tais como vidro ou quartzo, ou de um plástico transparente, de preferência, selecionado a partir do grupo compreendendo policarbonatos, poliimidas, polimetacrilatos, poliestirenos, poliolefinas cíclicas e/ou copolímeros de poliolefinas cíclicas, de preferência, a partir de poliolefinas cíclicas ou de copolímeros de poliolefinas cíclicas. Exemplos de plásticos adequados, para a preparação da camada (b) opticamente transparente, são descritos no documento de número WO/020488.

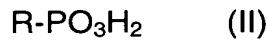
É dada preferência, a plásticos termoplásticos transparentes ou injetáveis, por exemplo, selecionados a partir do grupo compreendendo policarbonato, poliimida, acrilato, em particular, poli(metacrilato de metila), ou poliestireno.

Em concretizações particulares do aparelho, a camada (a) de guia de onda opticamente transparente pode compreender óxidos selecionados a partir do grupo compreendendo TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 e/ou ZrO_2 , de preferência, selecionados a partir do grupo compreendendo TiO_2 , Ta_2O_5 e/ou Nb_2O_5 . Combinações de vários de tais óxidos também podem ser usadas. É dada preferência a uma camada (a) de guia de onda opticamente transparente sendo feita de TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 ou ZrO_2 , de preferência, de TiO_2 , Ta_2O_5 ou Nb_2O_5 . Foi provado como especialmente vantajoso o uso de pentóxido de tântalo.

Em concretizações preferidas, a guia de onda de filme fino, compreendendo, em particular na camada opticamente transparente, óxidos selecionados a partir do grupo compreendendo TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 e/ou ZrO_2 , compreende mono- ou multi-camadas de ácidos organofosfóricos da seguinte fórmula (I)



e/ou ácidos organofosfônicos da seguinte fórmula (II)



e/ou seus sais, sendo que

R é uma C₁₀ a C₂₄ alquila.

De preferência, são utilizáveis ácidos organofosfóricos e/ou ácidos organofosfônicos, de preferência, organofosfatos e/ou organofosfonatos, sendo que R é selecionados a partir do grupos compreendendo C₁₀ a 20 alquila não ramificada, de preferência, selecionado a partir do grupo compreendendo C₁₂ a C₁₈ alquila não ramificada, de preferência, selecionado a partir do grupo consistindo em ácido dodecilfosfórico, dodecilfosfato, octadecilfosfonato e/ou ácido octadecilfosfônico.

É dada preferência a ácidos organofosfóricos ou organofosfatos, 10 que podem ser aplicados por meio de sais solúveis em água, a partir de uma solução aquosa, à guia e onda de filme fino.

Em concretizações preferidas, os ácidos organofosfóricos e/ou ácidos organofosfônicos, de preferência organofosfatos, são aplicados por meio de uma monocamada à guia de onda de filme fino, em particular, um 15 biochip de campo evanescente, de preferência, um biochip de guia de onda óptica planar.

A monocamada pode ser aplicada como uma camada de promoção de adesão, à camada opticamente transparente, feita de óxidos. De maneira vantajosa, ácidos organofosfóricos e/ou ácidos organofosfônicos 20 podem interagir com elementos de reconhecimento, em particular com elementos de reconhecimento acoplados a proteínas de veículo, e intensificar a ligação aos elementos de reconhecimento ao biochip.

Em uma forma preferida do aparelho, os ácidos organofosfóricos e/ou ácidos organofosfônicos, de preferência organofosfatos, são aplicados 25 à guia de onda de filme fino, de preferência, à camada opticamente transparente feita de óxidos, por meio de uma camada de promoção de adesão. A camada de promoção de adesão pode intensificar a ligação dos elementos de reconhecimento à guia de onda de filme fino ou ao biochip.

É dada preferência à camada de promoção de adesão tendo 30 uma espessura de menos do que 200 nm, de preferência, de menos do que 20 nm.

A luz de excitação é, de preferência, acoplada à camada (a) de

guia de onda opticamente transparente por uso de uma ou mais estruturas de grade.

Tal estrutura de grade é, de preferência, uma grade de alívio com qualquer perfil, por exemplo, com um perfil retangular, triangular ou semi-circular, ou uma grade de fase ou grade de volume com uma modulação periódica do índice de refração na camada (a) opticamente transparente essencialmente planar. A estrutura de grade também pode ser uma grade difrativa com um período uniforme ou pode ser uma grade multidifrativa. A estrutura de grade pode ter uma periodicidade que varie no espaço de maneira perpendicular ou paralela à direção de propagação da luz de excitação acoplada à camada (a) de guia de onda opticamente transparente.

É dada preferência às estruturas de grade utilizáveis para acoplamento à luz de excitação tendo um período na faixa desde 200 nm a 1.000 nm, de preferência, na faixa de desde 200 nm a 400 nm. Além disso, é dada preferência ao fator de transferência de modulação da grade estando na faixa de desde 3 nm a 60 nm, de preferência, na faixa de desde 10 a 40 nm. É dada preferência à razão de fator de transferência de modulação para a espessura da primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente sendo igual a ou menor do que 0,4. Igualmente, é dada preferência à modulação do índice de refração sendo pronunciada tanto na interface entre a camada (a) e a camada (b) e na interface da camada (a) para o meio de análise.

É dada preferência à camada (a) de guia de onda opticamente transparente tendo uma espessura na faixa desde 40 nm a 1.000 nm, de preferência, na faixa desde 40 nm a 300 nm, mais preferivelmente, na faixa desde 80 nm a 200 nm.

A diferença de índices de refração entre as camadas (a) e (b) é, de preferência, $\geq 0,2$, de preferência, $\geq 0,5$, e mais preferivelmente, de 0,56.

A luz de excitação tem um comprimento de onda, de preferência, na faixa de desde 300 nm a 1.100 nm, de preferência, na faixa de desde 300 nm a 800 nm, mais preferivelmente, na faixa de desde 500 nm a 700 nm.

Luz de excitação adequada pode ser acoplada por meio de uma

estrutura de grade, a jusante da qual, na direção de propagação da luz acoplada guiada para a camada (a), existe uma região não modulada da camada (a), que contém um conjunto de uma multiplicidade de áreas de medição, sobre as quais as várias micotoxinas são detectadas. A jusante disso, na 5 direção de propagação da luz guiada, podem estar, de maneira vantajosa, uma ou mais outras estruturas de grade com outro conjunto de áreas de medição a jusante delas. Alternativamente, as áreas de medição de um conjunto ou, ainda, de uma multiplicidade de conjuntos podem estar na região modulada da camada (a).

10 De preferência, na direção de propagação da luz de excitação acoplada, a jusante de cada conjunto de áreas de medição é designada uma estrutura para acoplamento externo da luz de excitação, estrutura esta é específica para o conjunto, sendo possível para as estruturas serem formadas de maneira específica para conjuntos individuais de maneira perpendicular à 15 direção de propagação da luz de excitação acoplada ou, ainda, se estenderem através de toda a guia de onda de filme fino nesta direção.

O aparelho pode ter um número muito grande de campos de medição individuais. Em concretizações preferidas do aparelho, os componentes de ligação específicos e/ou por afinidade, como elemento de reconhecimento químico ou bioquímico, são aplicados por meio de até 100.000 20 campos ou pontos de medição em uma disposição bidimensional, com um único campo ou ponto de medição, tendo uma área, de preferência, na faixa de desde 0,001 mm² a 6 mm², de preferência, na faixa de desde 0,1 mm² a 1 mm². É dada preferência a mais do que 10, de preferência, a mais do que 50 25 campos de medição por centímetro quadrado sendo aplicados à guia de onda de filme fino ou ao biochip.

A invenção se refere adicionalmente a um kit para detecção de micotoxinas. O kit compreende pelo menos uma guia de onda de filme fino compreendendo uma primeira camada (a) e guia de onda opticamente 30 transparente sobre o topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a), sobre cuja guia de onda estão imobilizados componentes de ligação específicos e/ou

por afinidade, como elemento de reconhecimento químico ou bioquímico para micotoxinas e/ou componente de ligação de uma maneira espacialmente separada.

O kit pode compreender, além disso, pelo menos um reagente 5 compreendendo, de preferência, componentes de ligação marcados. O kit também pode compreender uma pluralidade de reagentes compreendendo, de preferência, componentes de ligação marcados ou um reagente compreendendo uma mistura de diferentes componentes de ligação marcados. Além disso, o kit pode compreender tampões e/ou solventes necessários a realização da detecção conforme reivindicada em qualquer das reivindicações 10 anteriores. A invenção também pode fornecer o kit para compreender uma unidade de detecção.

Os kits podem ser usados para a detecção rápida de micotoxinas.

15 Um exemplo, que serve para ilustrar a presente invenção, é dado abaixo.

Exemplo 1

Estabelecimento de uma curva padrão para a medição de zearalenona em um imunoensaio indiretamente competitivo sobre um biochip de 20 campo evanescente

Sete biochips (Unaxis, Liechtenstein), com dimensões externas de 1 cm x 2 cm, feito de vidro, no qual fora inscrita uma grade óptica com uma profundidade de grade de 18 nm, e dotada com uma camada de 155 nm de pentóxido de tântalo, foram revestidos com ácido octadecilfosfônico 25 por imersão deles em uma solução 500 µM de ácido octadecilfosfônico em n-heptano / isopropanol (9:1). Conjugados de zearalenona e albumina de soro bovino (ZEA-ASB, razão ZEA : ASB = 50:1, preparada por Biopure, Tulln, Áustria) e moléculas de ASB marcadas com o corante DyLight 647 (Pierce, Alemanha) (DyLight 647-ASB) foram aplicadas ao biochip com o auxílio 30 de um ponteador do tipo "Biochip Arrayer" (Perkin Elmer, Alemanha). As soluções de aplicação de pontos continham DyLight 647-ASB em uma concentração de 5×10^{-4} mg/mL em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 10

mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) contendo ASB a 0,1% e Tween 20 a 0,1%, conjugado de ASB-ZEA 0,5 mg/mL em PBS contendo ASB a 0,1% e Tween 20 a 0,1%. Os pontos foram aplicados ao chip em novas linhas alternadas de, em cada caso, 10 pontos de DyLight 647-ASB e pontos de conjugado de ASB-ZEA, por meio de dois campos (conjuntos).

Os pontos foram incubados em elevada umidade (40%) durante uma noite e os biochips foram, então, tratados com uma solução de ASB de 3% de força em PBS, durante 4 horas. Câmaras de medição foram aplicadas ao chip, de uma maneira tal que dois conjuntos, com câmaras de reação separadas, forma formados em cada chip. Soluções aquosas de zearalenona, em várias concentrações, na faixa de desde 0 µg/L a 31 µg/L, foram preparadas e adicionadas sob mistura com um anticorpo antizearalenona monoclonal (Biotez, Berlim), marcado com DyLight 647, produzindo, assim, em cada caso, uma solução 1 nM de anticorpos.

As misturas de diferentes concentrações foram introduzidas, em cada caso, nas câmaras de medição, e os biochips foram medidos sem etapas de tratamento adicionais em um leitor de fluorescência "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Alemanha), dez minutos ou menos. As intensidades de fluorescência obtidas para cada ponto de zearalenona foram divididas pela média das intensidades de fluorescência dos pontos de DyLight 647-ASB, acima e abaixo do ponto particular. Foram determinadas as médias das intensidades de fluorescência de todos os 40 pontos de um conjunto. As intensidades de fluorescência dependentes da concentração obtidas foram ajustadas por um ajuste sigmoidal com o auxílio do programa de computador Origin 7G (Origin Lab Corporation, EUA).

Constatou-se que a avaliação da intensidade de fluorescência das amostras permitiram que a concentração de ZEA fosse quantificada em uma faixa de desde 0,4 ppb a 4 ppb de zearalenona, correspondendo a 80% e, respectivamente, 20% de intensidade de fluorescência máxima na curva sigmoidal ajustada, correspondendo a uma faixa de desde 1 nM a 10 nM da concentração de ZEA usada na solução.

Exemplo 2

Estabelecimento de uma curva padrão para a medição de deoxinivalenol (DON) e medição de uma amostra de cereal de ração animal contaminada

15 biochips (Unaxis, Liechtenstein), com dimensões externas de 1 cm x 2 cm, feito de vidro, no qual fora inscrita uma grade óptica (profundidade de grade de 18 nm), dotada com uma camada de pentóxido de tântalo (155 nm), foram revestidos com ácido octadecilfosfônico (por imersão deles em uma solução de ácido octadecilfosfônico em n-heptano / isopropanol (9:1)). Conjugados de deoxinivalenol e albumina de soro bovino (DON-ASB, razão DON : ASB = 100:1, preparada por Biopure, Tulln, Áustria) e IgG de cão (Rockland, EUA) foram aplicadas ao biochip com o auxílio de um ponteador do tipo Nanoplotter (GeSiM, Alemanha). As soluções de aplicação de pontos consistiam em IgG de cão em uma concentração de 0,2 mg/mL em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) contendo trealose, em conjugado de DON-ZEA em uma concentração de 1 mg/mL em PBS contendo trealose. Os pontos foram aplicados ao chip na forma de duas linhas de, em cada caso, 12 pontos de IgG e uma linha de 12 pontos de conjugado de ASB-DON entremeados, por meio de dois campos (conjuntos).

Os pontos foram incubados a 37°C durante 1 horas, e os biochips foram, então, tratados com uma solução de ASB em PBS durante até 4 horas. Câmaras de medição foram aplicados aos chips de uma maneira tal que dois conjuntos de câmaras de reação separadas foram formadas em cada chip. 5 g de farinha de trigo não contaminada foram extraídos por agitação com uma solução de metanol a 70% em água (v/v) durante 5 minutos. O extrato foi centrifugado e, então, diluído com um tampão de citrato Tris (pH 7,4) contendo ASB, caseína, pó de leite em pó de baixo teor em gordura, Tween 20, polietileno glicol e sacarose, em uma razão de 1:4 (v/v, extrato : tampão). Soluções de deoxinivalenol em várias concentrações (15 a 150 µg/L) foram preparadas e adicionadas sob mistura com um anticorpo antideoxinivalenol monoclonal marcado com DyLight 647, e com um anticorpo anti-IgG de cabra monoclonal, igualmente marcado com DyLight 647, produzindo, assim, em cada caso, uma solução 1 nM de anticorpos.

As soluções de diferentes concentrações foram, em cada caso, introduzidas nas câmaras de medição e os biochips foram medidos, sem etapas de tratamento adicionais, em um leitor de fluorescência "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Alemanha), durante 10 minutos ou menos. As 5 intensidades de fluorescência obtidas para cada ponto de deoxinivalenol foram divididas pela média de intensidades de fluorescência do ponto de IgG de cão acima e abaixo do ponto particular. As médias normalizadas das intensidades de fluorescência de todos os 12 pontos de DON de um conjunto foram determinados. As intensidades de fluorescência normalizadas, dependentes da concentração, obtidas foram ajustada por um ajuste potencial com 10 o auxílio de um programa de computador.

Similarmente ao processo de extração ilustrado acima, 5 g de uma amostra de refeição de cereal de ração animal contaminado com DON (Coring, Alemanha, 526 ppb de DON certificadas) foram extraídos, e o extra- 15 to foi diluído. A 300 µL do extrato diluído, foram adicionados um anticorpo antideoxinivalenol monoclonal marcado com DyLight 647 e um anticorpo anti-IgG de cão de cabra monoclonal, igualmente marcado com DyLight 647, de maneira tal que, em cada caso, foi produzida uma solução 1 nM de anticorpos. Em cada caso, foram introduzidos 100 µL da solução em uma câma- 20 ra de medição, e os biochips foram medidos, sem etapas de tratamentos adicionais, em um leitor de fluorescência "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Alemanha) durante dez minutos ou menos. As intensidades de fluorescência obtidas para cada ponto de deoxinivalenol foram divididas pela média das intensidades de fluorescência do ponto de IgG de cão acima e 25 abaixo do ponto particular. As médias normalizadas das intensidades de fluorescência de todos os 12 pontos de DON de um conjunto foram determinadas. As intensidades de fluorescência obtidas foram convertidas com o auxílio da curva padrão acima descrita para concentrações de DON na refeição de cereal de ração animal, resultando em uma média de 590 ppb sobre as 30 três medições.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a detecção rápida de micotoxinas, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas seguintes:
 - a) fornecimento de uma guia de onda de filme fino compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente no topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a), à cuja guia de onda são immobilizados componentes de ligação específicos e/ou por afinidade como um elemento de reconhecimento químico ou bioquímico para micotoxinas
 - 5 b) aplicação de uma amostra contendo micotoxina(s) e componentes de ligação aos componentes de ligação immobilizados sobre a guia de onda de filme fino,
 - c) detecção de um sinal no campo evanescente devido à interação dos componentes de ligação immobilizado sobre a guia de onda de filme fino com as micotoxinas a partir da amostra e/ou com os componentes de ligação,
 - 15 d) determinação da quantidade de micotoxina(s) presente(s) na amostra.
- 20 2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que mono- ou multicamadas de ácidos organofosfóricos da seguinte fórmula (I)
$$R-OPO_3H_2 \quad (I)$$
e/ou de ácidos organofosfônicos da seguinte fórmula (II)
$$R-PO_3H_2 \quad (II)$$
e/ou de seus sais, são aplicadas à guia de onda de filme fino, sendo que R é um grupo C₁₀ a C₂₄ alquila.
- 30 3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que são usados ácidos organofosfóricos, ácidos organofosfônicos, organosfatos e/ou organofosfonatos, com R sendo seccionado a partir do grupo compreendendo C₁₀ a C₂₀ alquila não ramificada, de preferência, selecionado a partir do grupo compreendendo C₁₂ a C₁₈ alquila não

ramificada, de preferência, ácidos organofosfóricos, ácidos organofosfônicos, organosfatos e/ou organofosfonatos selecionados a partir do grupo compreendendo ácido dodecilfosfórico, dodecilfosfato, octadecilfosfonato e/ou ácido octadecilfosfônico.

5 4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é usada uma guia de onda de filme fino compreendendo uma camada (a) de guia de onda opticamente transparente compreendendo óxidos selecionados a partir do grupo compreendendo TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 e/ou ZrO_2 , de preferência, selecionados a partir do 10 grupo compreendendo TiO_2 , Ta_2O_5 e/ou Nb_2O_5 .

5 15 5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que os componentes de ligação são selecionados a partir do grupo compreendendo anticorpos antimicotoxina, conjugados de antimicotoxina - anticorpo, micotoxinas, conjugados de micotoxina, fragmentos de anticorpos antimicotoxina, peptídeos de ligação à micotoxina, anticalinas de ligação à micotoxina, aptâmeros de ligação à micotoxina, espelhômeros de ligação à micotoxina e/ou polímeros impressos de ligação à micotoxina, de preferência, selecionados a partir do grupo compreendendo anticorpos antimicotoxina, conjugados antimicotoxina - anticorpo, micotoxinas e/ou conjugados de micotoxina. 20

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que um elemento de marcação, de preferência, um fluoróforo, está ligado a micotoxinas por meio de uma proteína, de preferência, por meio de albumina de soro bovino.

25 7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a amostra é um ítem alimentício para seres humanos ou animais, de preferência, selecionado a partir do grupo compreendendo cereais, vinho, sucos, frutas e/ou produtos contendo cereais, vinho, sucos e/ou frutas, ou um extrato dos ítems alimentícios ou produtos 30 que tenham sido extraídos com um solvente ou mistura de solventes.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a amostra é incubada com os componen-

tes de ligação imobilizados como elemento de reconhecimento químico ou bioquímico e/ou os componentes de ligação, menos do que 15 minutos, de preferência, menos do que 10 minutos, antes da detecção do sinal.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que as micotoxinas são selecionadas a partir do grupo compreendendo aflatoxinas, ocratoxinas, alcalóides de cravagem do centeio, patulina e/ou toxinas de *fusarium*, por exemplo, selecionadas a partir do grupo compreendendo deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2 e/ou toxina HT-2 e/ou fumonisinas, de preferência, selecionadas a partir do grupo compreendendo ocratoxina A, deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, fumonisina B1, fumonisina B2 e/ou fumonisina B3.

10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que micotoxinas são detectadas no extrato de cereal mesmo na faixa de micotoxina desde 0,1 pM a 100 nM, de preferência, na faixa de micotoxina desde 1 pM a 1 nM.

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a detecção é realizada por meio de um imunoensaio, de preferência, um imunoensaio competitivo, especialmente de preferência, um imunoensaio competitivo indireto.

12. Aparelho para a realização do processo para a detecção rápida de micotoxinas, caracterizado pelo fato de que o aparelho tem uma guia de onde de filme fino compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente no topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a).

13. Aparelho, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a camada (b) opticamente transparente da guia de onda de filme fino, compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente no topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a), é feita de silicatos, tais como vidro ou quartzo ou de um plástico transparente,

de preferência, selecionado a partir do grupo compreendendo policarbonatos, poliimidas, polimetacrilatos, poliestirenos, poliolefinas cíclicas e/ou copolímeros de poliolefinas cíclicas, de preferência, de poliolefinas cíclicas.

14. Aparelho, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que a camada (a) de guia de onda opticamente transparente tem uma espessura na faixa de desde 40 nm a 1.000 nm, de preferência, na faixa de desde 40 nm a 300 nm, ainda mais preferivelmente, na faixa de desde 80 nm a 200 nm.

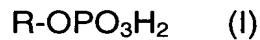
15. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 12 a 14, caracterizado pelo fato de que a luz de excitação está acoplada à camada (a) de guia de onda opticamente transparente por uso um ou mais estruturas de grade.

16. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 15, caracterizado pelo fato de que as estruturas de grade utilizáveis 15 para o acoplamento à luz de excitação têm um período na faixa de desde 200 nm a 1.000 nm, de preferência, na faixa de desde 200 nm a 400 nm.

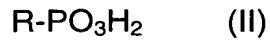
17. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 16, caracterizado pelo fato de que a grade tem um fator de transferência de modulação na faixa de desde 3 nm a 60 nm, de preferência, na faixa 20 de desde 10 a 40 nm.

18. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, caracterizado pelo fato de que a luz de excitação tem um comprimento de onda na faixa de desde 300 nm a 1.100 nm, de preferência, na faixa de desde 300 nm a 800 nm, ainda mais preferivelmente, na faixa de 25 desde 500 nm a 700 nm.

19. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 18, caracterizado pelo fato de que mono- ou multi-camadas de ácidos organofosfóricos da seguinte fórmula (I)



30 e/ou de ácidos organofosfônicos da seguinte fórmula (II)



e/ou de seus sais, são aplicadas à guia de onda de filme fino, sendo que

R é um grupo C₁₀ a C₂₄ alquila.

20. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 19, caracterizado pelo fato de que os elementos de reconhecimento são aplicados por meio de até 100.000 campos de medição em uma disposição 5 bidimensional, com um campo de medição único tendo uma área, de preferência, na faixa de desde 0,001 mm² a 6 mm², de preferência, na faixa de desde 0,1 mm² a 1 mm².

21. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 20, caracterizado pelo fato de que mais do que 10, de preferência, mais 10 do que 50 campos de medição por centímetro quadrado são aplicados à guia de onda de filme fino.

22. Kit para a detecção rápida de micotoxinas, caracterizado pelo fato de que o kit contém pelo menos uma guia de onda de filme fino compreendendo uma primeira camada (a) de guia de onda opticamente transparente no topo de uma segunda camada (b) opticamente transparente, com (b) tendo um índice de refração mais baixo do que (a), à cuja guia de onda 15 são imobilizados componentes de ligação específicos e/ou por afinidade como um elemento de reconhecimento químico ou bioquímico para micotoxinas e/ou um componente de ligação de uma maneira separada espacialmente. 20

23. Kit, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que ele compreende um reagente compreendendo, de preferência, componentes de ligação marcada de maneira fluorescente.

24. Aplicação de um kit, como definido na reivindicação 22 a 23, 25 caracterizada pelo fato de que é para a detecção rápida de micotoxinas.

RESUMO

Patente de Invenção: "**PROCESSO PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOTOXINAS, APARELHO PARA A REALIZAÇÃO DESTE, KIT PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE MICOTOXINAS E APLICAÇÃO DO MESMO**".

5 A invenção refere-se a um aparelho e a um processo para a detecção de micotoxinas e a kits adequados para a realização do processo.