



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos

Thiago Pereira Motta¹ e Keila Maria Roncato Duarte^{2*}

¹Aluno de Mestrado em Produção Animal Sustentável. Instituto de Zootecnia /APTA Rua Heitor Penteado, 56. Nova Odessa, SP 13460-000

²Docente do curso de Mestrado em Produção Animal Sustentável. Instituto de Zootecnia/APTA. Rua Heitor Penteado, 56 Nova Odessa, SP 13460-000

* email: keila@iz.sp.gov.br

Resumo

A necessidade de monitorar grandes volumes de grãos, leite e derivados lácteos no que se refere à presença de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 e seus limites estabelecidos por lei, pede a utilização de métodos analíticos rápidos, eficientes e baratos. O ensaio imunoenzimático em meio sólido (ELISA) tem se mostrado como uma ferramenta de grande importância para a análise de aflatoxinas em alimentos, pois agrega as características necessárias para tal fim. O ELISA competitivo direto, sem dúvida, é o mais utilizado na análise de aflatoxinas em grãos e leite e derivados. A recomendação da utilização do ELISA como método de rastreamento rápido para aflatoxinas é unânime em todo o mundo.

Palavras-chave: imunoensaio, método de rastreamento, micotoxinas, segurança alimentar.

ELISA on the detection of food aflatoxins

Abstract

The need to monitoring large volumes of grain, milk and dairy products as regards the presence of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and M1 and limits established by law, seeks the use of rapid analytical methods, efficient and cheap. The enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) has been recommended as a tool of great importance for aflatoxins analysis in foods, because its aggregates the features necessary for such purpose. The direct competitive ELISA, no doubt, is the most used in the analysis of aflatoxins in grains and dairy products. The recommendation of ELISA use for rapid screening method for aflatoxins is unanimous in the world.

Keywords: food safety, mycotoxins, screening methods, imunoassay

1. INTRODUÇÃO

Diante de um cenário em que a exigência por qualidade e segurança na produção, processamento e comercialização de alimentos é cada vez mais rigorosa, tanto no âmbito nacional como no internacional, faz-se necessário o uso de medidas de fiscalização e monitoramento da integridade sanitária e nutricional dos alimentos produzidos e comercializados no país.

A ocorrência de aflatoxinas em alimentos é um fato que preocupa pela toxidez desta substância. As aflatoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos que se desenvolvem, principalmente, em grãos armazenados inadequadamente ou por períodos de tempo prolongado. Os alimentos contaminados por aflatoxinas representam um risco à saúde dos seres que o ingerem devido aos seus efeitos tóxicos. Por isso a preocupação em detectar e quantificar essas substâncias para que a população não venha consumir doses de aflatoxina acima do permitido por lei.

Algumas metodologias, como é o caso do ELISA, vêm contribuindo para a otimização do monitoramento da qualidade de alimentos devido a sua praticidade, rapidez e custo reduzido (AMARAL E JÚNIOR, 2006; WHO, 2001; ZHENG et al., 2006). Por isso, através desse trabalho de revisão temos o objetivo esclarecer o que vem a ser ELISA, a sua aplicação e importância na detecção de aflatoxinas em alimentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1. ELISA

O ELISA, do termo inglês (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*), ou ensaio imunoenzimático em suporte sólido, é uma técnica baseada no princípio da interação específica entre anticorpo e antígeno (aflatoxina) (ZHENG et al., 2006). Segundo AMARAL e JÚNIOR (2006), a metodologia apresenta dois passos, sendo o primeiro a reação entre o anticorpo e o antígeno e o segundo a revelação da reação pela hidrólise enzimática que ocorre entre o complexo antígeno-enzima e o substrato.

O ELISA pode ser feito com anticorpos policlonais ou monoclonais, contudo, os anticorpos monoclonais são mais específicos e reduzem as chances da ocorrência de falso-positivos. Os anticorpos são extraídos de cobaias (camundongo, coelho, galinha, cavalo, etc.) que são induzidos a produzir anticorpos mediante inoculação do antígeno.

O ELISA é indicado como teste de rastreamento (WHO, 2001) ou como teste qualitativo em alimentos de origem animal e vegetal, podendo ser usado, também, para quantificar aflatoxinas em alimentos. Sua utilização em análises de controle de qualidade de alimentos contribui para a otimização do processo de detecção de aflatoxinas graças a sua sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de manuseio (AMARAL e JUNIOR, 2006; OLIVEIRA et al., 2000; SCOTT, 1995; WHITAKER et al., 1994 apud KAWASHIMA, 2004; WHO, 2001; ZHENG et al., 2006). Além disso, é uma técnica de baixo custo e que não exige

mão-de-obra especializada (LÚCIO et al., 2007; WHO, 2001; ZHENG et al., 2006).

Atualmente, a recomendação que se faz é de que os resultados positivos do teste de ELISA devem ser acompanhados de técnicas cromatográficas instrumentais mais específicas para devida confirmação.

Trata-se de um método eficiente, capaz de detectar concentrações de aflatoxina a partir de 2,5 ppb (ZHENG et al., 2006). Porém, tem como desvantagem a alta incidência de resultados falso-positivos, variabilidade de resultados, de 30 a 300%, baixa reprodutibilidade e possibilidade de resultado falso-negativo (AMARAL e JUNIOR, 2006).

OLIVEIRA e GERMANO (1996) ao avaliar o desempenho do ELISA na quantificação de Aflatoxina M₁ em leite em pó reconstituído contaminado artificialmente não verificaram diferença significativa entre as concentrações adicionadas e as concentrações detectadas nas amostras de leite.

SYLOS et al. (1996) comparando ELISA e Cromatografia em Minicoluna para triagem não encontraram diferença entre os dois métodos e ainda destaca a rapidez do ELISA frente ao outro método, 20 minutos/amostra para o ELISA contra 40 minutos/amostra para a minicoluna.

SOUZA et al. (1999) estudando a eficiência de um kit comercial de ELISA na determinação e quantificação de aflatoxina M₁ em leite observou um limite de detecção menor que 0,010 ppb, entretanto, somente 18,5% dos resultados positivos foram confirmados pela Cromatografia em Camada Delgada (CCD). As concentrações encontradas variaram de 0,038 a 0,071 ppb. Os autores levantaram a possibilidade de reações cruzadas com aflatoxinas ou moléculas semelhantes, mas em todo caso recomendam a confirmação dos resultados.

AMARAL et al. (2006) comparando a CCD com ELISA na análise de produtos derivados de milho encontraram concentrações de aflatoxinas variando de 4,1 a 13,7 ppb com a CCD e 3,3 a 23,9 ppb com o ELISA. Os autores dizem que o ELISA é adequado para testes rápidos de triagem, mas que deve ter seus resultados confirmados por um método alternativo de detecção como precaução a resultados falso-positivos e falso-negativos. A

afirmação de AMARAL et al., (2006) corrobora com a WHO (2001) que recomenda a confirmação dos resultados positivos do ELISA com métodos de referência aceitos, em caso de fins jurídicos.

Estudando o ELISA não competitivo indireto na detecção e quantificação de Aflatoxina B₁ em grãos de milho, arroz e sorgo LÚCIO et al. (2007) observaram limite de detecção abaixo de 5,0 ppb, demonstrando sensibilidade adequada para análise de Aflatoxina B₁.

KIM et al. (2000) apud WHO (2001), ao analisar níveis de aflatoxina M1 em leite pasteurizado, fórmula infantil, leite em pó e iogurte, utilizando ELISA e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência não encontraram diferença significativa entre os resultados obtidos com os dois métodos.

Existem diversos tipos de ELISA, contudo, nós faremos menção somente aos mais utilizados para detecção de aflatoxinas em alimentos: ELISA de competição e de não competição (direta ou indireta). Entretanto, o ELISA de competição direto é o mais utilizado e estudado para aflatoxinas (WHO, 2001; ZHENG, 2006).

2.1.2. ELISA competitivo e não competitivo

No ELISA de competição ou competitivo, a substância a ser analisada (analito), nesse caso a aflatoxina, aparece em concentrações variáveis dentro da amostra a ser analisada, e ao ser colocada em contato com o anticorpo específico, compete com uma quantidade constante de aflatoxina previamente imobilizada na fase sólida. A concentração do anticorpo deve ser limitada para garantir a eficácia da competição.

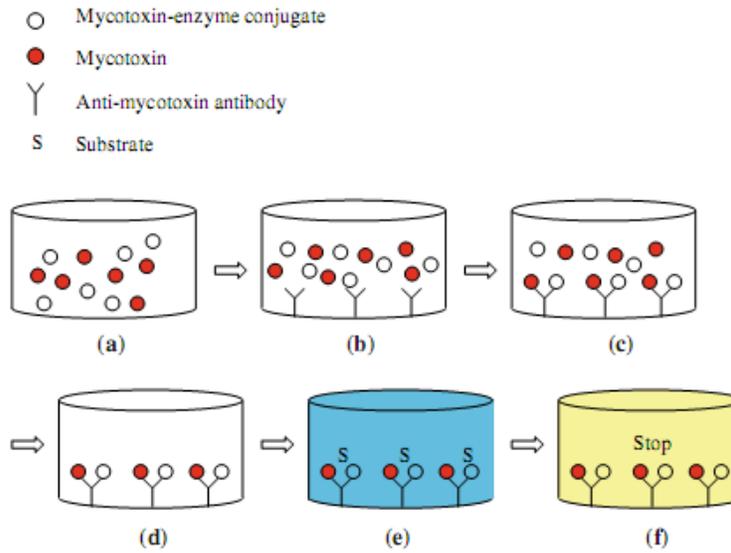


Figura 01. Princípio do ELISA competitivo direto para análises de micotoxinas. **Fonte:** (ZHENG et al., 2006).

No ELISA não competitivo, o anticorpo reage proporcionalmente com a quantidade de aflatoxina contida na amostra. Para detecção (revelação) do anticorpo ligado a aflatoxina utiliza-se a técnica direta ou a técnica indireta.

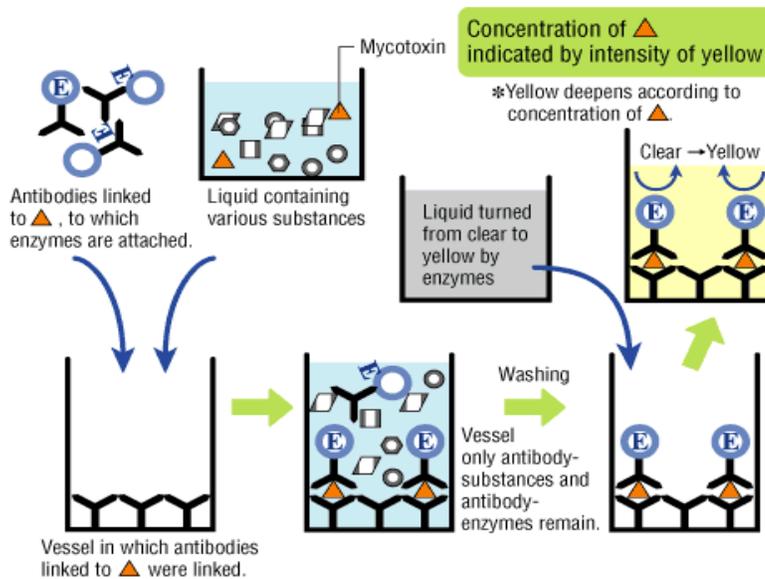


Figura 02. ELISA não competitivo direto ou tipo sanduíche. **Fonte:** <http://www.microvet.arizona.edu/courses/mic419/ToolBox/elisa3.jpg>

2.1.3. Revelação direta e indireta.

Na técnica direta, o anticorpo específico com um título constante é fixado sobre a placa ou tubo de microtitulação. Em seguida, a solução de amostra e uma quantidade conhecida constante de conjugado toxina-enzima são incubados simultaneamente. Depois da lavagem, a toxina-enzima ligada à placa por intermédio do anticorpo é revelada por junção de um substrato cromogênico específico de enzima. A cor obtida é medida por fotometria ou apreciada visualmente. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de aflatoxina na amostra (ZHENG, 2006).

Na técnica indireta, a revelação ocorre através de um segundo anticorpo conjugado a uma enzima. A solução da amostra a ser analisada é incubada simultaneamente com uma quantidade constante de anticorpo conjugado. Se houver aflatoxina na amostra ela irá reagir com o anticorpo previamente fixado na no fundo da cubeta e o segundo anticorpo se ligará a esse complexo (anticorpo-aflatoxina) e formará outro complexo (anticorpo-aflatoxina-segundo anticorpo-enzima). Após a lavagem é adicionada uma solução que reagirá com o complexo tornando o meio colorido. A intensidade da cor é diretamente proporcional a concentração de aflatoxina existente na amostra. Quando se adquire um kit de ELISA, a microplaca ou a cubeta já vem com os antígenos aderidos à parede da mesma.

As enzimas mais utilizadas são a catalase, a glucose-oxidase, a galactosidase, a fosfatase alcalina e a peroxidase.

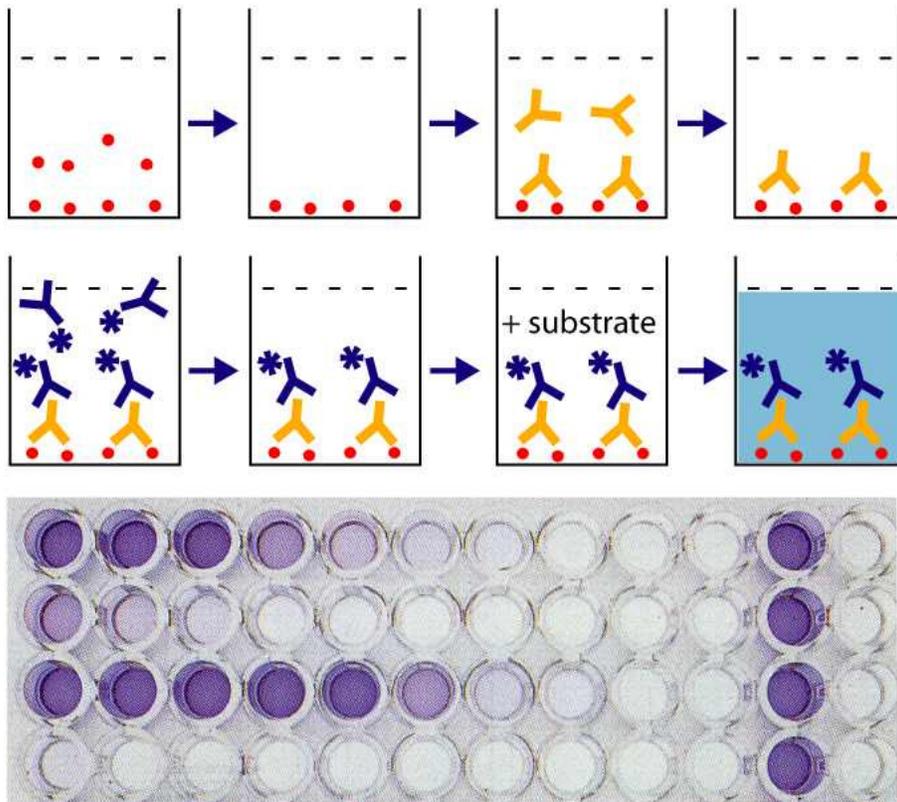


Figura 03. ELISA não competitivo indireto.

Fonte: <http://www.microvet.arizona.edu/courses/mic419/ToolBox/elisa3.jpg>

2.2. Extração das aflatoxinas

A extração das aflatoxinas é feita mediante uso de solventes diversos, na sua maioria de caráter polar. Contudo, antes da extração com solventes ou para que ela tenha eficácia é necessário triturar ou macerar as amostras de alimentos a serem analisados. Após a infusão em solvente a solução é filtrada e submetida ao ensaio. No caso do leite, uma centrifugação é recomendada para extração da fase gordurosa. A tabela abaixo mostra os diversos solventes utilizados para esse fim.

Tabela 1. Solventes utilizados para extração de aflatoxinas em grãos.

Solventes extratores	Proporção
Metanol:água	70:30
Metanol:água	6.5:3.5
Metanol:água→hexano	80:20→5
Acetonitrila: água	9:1
Celite:água:clorofórmio	25g:10ml:250ml
Acetonitrila:água	9:1
Metanol:água	8:2
Metanol:KCl	9:1
Clorofórmio:água	30:1
Acetonitrila:água	9:1
Clorofórmio:água	30:1

Adaptado de AMARAL e JÚNIOR (2006).

2.3. Aflatoxinas

As aflatoxinas compreendem um grupo de substâncias cristalizáveis de baixo peso molecular, com estrutura química bifuranocumarínica e possuem uma ação extremamente tóxica para o homem e para os animais (WHO, 1979, apud POZZI, 2000; ROBRIGUES e LOPES, 2006). Já foram descritos 18 compostos diferentes, mas apenas 04 aflatoxinas são bem conhecidas e estão, até o momento, intimamente relacionadas a surtos de intoxicação. Cada molécula é designada por uma letra referente ao tipo de fluorescência que emite sob luz ultravioleta: B₁, B₂, G₁ e G₂. A letra "B" representando a fluorescência azul, do inglês "blue", e a letra "G", representando a fluorescência verde, do inglês "green" (Hartley *et al.*, 1963 apud POZZI, 2000).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos para consumo humano estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde, resolução 274, de 15 de outubro de 2002, estabelece limites máximos de aflatoxinas admissíveis no milho (20,0µg/kg), amendoim (20,0µg/Kg) e leite (aflatoxina.M₁, 0,5 µg/l). Para rações e ingredientes destinados à alimentação animal o Ministério da Agricultura, através da Portaria 7, de 09 de novembro de 1988, estabelece o limite máximo de aflatoxinas em 50µg/Kg.

As aflatoxinas estão entre as micotoxinas mais tóxicas que se conhecem e tem sido implicadas na morte de animais e humanos que consomem alimentos contaminados. Em geral, a ingestão das aflatoxinas resulta em uma variedade de sintomas clínicos que dependem da quantidade consumida, da idade, espécie e raça do animal. A principal síndrome que acarretam é hepatotóxica, entretanto podem afetar também os sistema renal e o cérebro (POZZI, 2000).

2.4. Fungos Produtores de Aflatoxinas

As aflatoxinas são produzidas, principalmente, pelo gênero fúngico *Aspergillus*, sendo o *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* as espécies de maior importância. O *A. flavus* produz somente aflatoxinas do grupo B, enquanto o *A. parasiticus* e o *A. nomius* produzem aflatoxinas dos grupos B e G (AMARAL et al., 2006; POZZI, 2000; RICHARD, 1993).

A contaminação dos alimentos pode ocorrer como resultado da invasão fúngica na planta durante a formação dos grãos no campo, na colheita, no transporte e durante o armazenamento, com redução da qualidade física, nutricional e sanitária dos cereais e oleaginosas. O milho, junto com o amendoim, é um dos principais produtos agrícolas contaminados pelas aflatoxinas.

Os fungos do gênero *Aspergillus*, normalmente, são encontrados no solo e em grãos armazenados, contudo, são considerados cosmopolitas saprófitos.

Durante o seu desenvolvimento o fungo produz as aflatoxinas como resultado do seu metabolismo primário, normalmente, no final da fase exponencial ou no início da fase estacionária do seu crescimento (GIMENO e MARTINS, 2003, citados por GIMENO, 2009). Sua capacidade de se desenvolver é limitada, basicamente, pela atividade de água (a_w) (umidade) dos grãos, já que as suas exigências mínimas de temperatura são baixas, em torno de 10 a 12°C. A a_w mínima necessária para o início do desenvolvimento e consequente produção de micotoxinas é de 0,75 e de 0,83, respectivamente. O *Aspergillus* cresce e pode produzir micotoxinas de forma ótima a 25° C, com uma actividade de água de 0,95. (HESSELTINE, 1976, apud GIMENO, 2009).

2.5. Importância e aplicação do ELISA na Detecção de Aflatoxinas em alimentos

O ELISA está entre os métodos imunológicos mais utilizados na pesquisa e determinação de aflatoxinas em alimentos, juntamente com RIA (radio immuno assay) e IAC (immunoaffinity chromatography). Sendo o ELISA, aprovado como método oficial da AOAC (Assotiation of Official Analitical Chemist's) para a triagem. A *World Health Organization* (WHO) e a *Food and Agriculture Organization* (FAO) também recomendam o ELISA como método de rastreamento de Aflatoxina M_1 para leite e derivados.

Graças a sua agilidade na obtenção de resultados é possível evitar que lotes ou volumes pequenos de alimento venham contaminar grandes quantidades, evitando prejuízos maiores, tanto do ponto de vista econômico quanto do ponto de vista da seguridade. Principalmente quando se fala de leite e derivados, onde a facilidade de contaminação é muito maior, o monitoramento dos níveis de aflatoxina M_1 no leite e derivados devem ser feitos com o auxílio do ELISA devido as vantagens já citadas que a metodologia apresenta.

Em grãos, como o milho o amendoim, a utilização de testes de rastreamento, como o ELISA, é fundamental devido a grande incidência dos

fungos produtores de aflatoxinas nesses alimentos. Uma vez que sua utilização na alimentação humana e animal se faz e larga escala, bem como de seus subprodutos.

3. CONCLUSÃO

A utilização do ELISA para detecção de aflatoxinas em alimentos, principalmente para triagem e testes qualitativos é uma ferramenta muito importante no monitoramento da qualidade de alimentos de origem vegetal e animal. O ELISA, diante dos ensaios realizados em diversos países, mostra-se um método confiável, eficiente e prático na detecção e até mesmo na quantificação de aflatoxinas em alimentos.

4. BIBLIOGRAFIA:

1- AMARAL, K. A. S. do; JUNIOR, M. M. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: Uma revisão. **Revista Analytica**, Maringá, n. 24, p. 60-62, ago./set. 2006.

2- AMARAL, K. A. S. do; NASCIMENTO G. B.; SEKIYAMA B. L.; JANEIRO V.; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26 n.2, p. 336-342, abr./jun. 2006.

3- GIMENO, A. Aflatoxina M1 no Leite; Riscos para a Saúde Pública, Prevenção e Controle. Disponível em: <http://pt.engormix.com/M A-pecuaria-leite/saude/artigos/aflatoxina-leite-riscos-saude_3.htm>. Acessado em: 05/05/2010.

4- KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110 p.. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

5- LÚCIO, C. H.; PINTO, N. F. J.; MARRIE, I. E. **Otimização do método de Elisa indireto não-competitivo para detecção e quantificação de aflatoxina B₁ em cereais**. Sete Lagoas: MAPA/EMBRAPA, dez. 2007. 7 p. (Comunicado Técnico 152, ISSN 1679-0162).

6- OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R. G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 369-374, 2000.

MOTTA, T.P. e DUARTE, K.M.R. ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 989, 2010.

7- OLIVEIRA, C. A. F. de; GERMANO, P. M. L. Avaliação do desempenho do método do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) em leite em pó reconstituído contaminado experimentalmente com aflatoxina M₁. **Rev. Saúde Pública**, v. 30, n. 6, 542-548, 1996.

8- POZZI, C. R. **Efeitos da administração oral prolongada de fumonisina B₁ e aflatoxina B₁ em ratos (Rattus norvegicus)**. 2000. 178 p.. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

9- RICHARD, J. L.; BENNETT, G. A.; ROSS, P. F.; NELSON, P. E. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. **J. Anim. Sci.**, v. 71 p. 2563-2574, 1993.

10- RODRIGUES, J.; LOPES, M. R. **Aflatoxinas**. 16 p. Faculdade de Farmácia/Universidade do Porto, Porto. Disponível em: <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/aflatoxinas/Aflatoxinas.pdf>>. Acesso em: 05/05/2010.

11- SYLOS, C. M. de; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; PINTO, C. A. P. A. Comparação de imunodosagem e cromatografia em minicoluna para triagem de aflatoxinas em amendoim e milho. **Alim. Nutr.**, São Paulo, v. 7, p. 7-14, 1996.

12 - SOUZA, S. V. C.; VARGAS E. A.; Roberto G. JUNQUEIRA, R. G. 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**, Campinas, vol.19 n.3 set./dez. 1999.

13- WORLD HEALTH ORGANIZATION & FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food (Who Food Additives Series 47 / FAO Food and Nutrition Paper)**. Geneva, 2001.

14- ZHENG, M. Z.; RICHARD, J. L.; BINDER, J.; A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia**. 161 : 261-273, 2006.l.