

AValiação DA EFICIÊNCIA DE DOIS KITS COMERCIAIS PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B₁ EM AMOSTRAS DE MILHO, RAÇÃO E AMENDOIM E SEUS PRODUTOS¹

SABINO, M.²; MILANEZ, T.V.²; LAMARDO, L.C.A.²; NAVAS, S.A.²; STOFER, M.² & GARCIA, C.B.²

RESUMO

Foi avaliada a eficiência de dois kits ELISA disponíveis no mercado para detecção de aflatoxina B₁, que permitem a triagem de milho contaminado com aflatoxina B₁ aos níveis de 5 e 20 ppb. Eles foram comparados ao método de Soares & Rodriguez-Amaya que utiliza cromatografia em camada delgada (CCD) e tem como limite de quantificação 4,0 µg/kg (ppb). Foram analisadas 53 amostras incluindo milho, ração para peixe e amendoim e produtos. Os resultados mostraram boa concordância entre as duas técnicas quanto à detecção de aflatoxina B₁. O método ELISA mostrou-se mais rápido, menos trabalhoso, utilizando menos solventes orgânicos, porém apresentou resultados presuntivos positivos, tornando necessária a sua confirmação.

Palavras-chave: cromatografia em camada delgada, ELISA, aflatoxina B₁.

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF TWO IMMUNOASSAY KITS FOR DETECTION OF AFLATOXIN B₁ IN CORN, FISH FEED, PEANUTS AND ITS PRODUCTS. The efficiency of two enzyme-linked immunosorbent ELISA assays, commercially available in Brazil for detection of aflatoxin B₁ were evaluated. These are screen tests designed to detect a minimum of 5 ppb and the other 20 ppb of aflatoxin B₁ in corn extracts, were compared with the method of Soares and Rodriguez-Amaya which utilizes thin-layer chromatographic (TLC) and has a quantification limit of 4.0 µg/kg (ppb). A total of 53 samples, including corn, fish feed, peanuts and its products were analysed. The results showed good agreement for aflatoxin B₁ levels. The ELISA method was much faster, less laborious, used less organic solvents than the TLC method, but it showed some presumptive positive samples, for this reason it is necessary to confirm the positive samples.

Key words: thin-layer chromatography, ELISA, aflatoxin B₁.

1 — INTRODUÇÃO

Um grande número de métodos analíticos tem sido desenvolvido para determinar micotoxinas em vários produtos, tanto para consumo humano como animal (1, 5, 9, 13, 14, 15).

Os métodos disponíveis na literatura, em sua maioria, são precisos porém necessitam de um preparo longo das amostras e, às vezes, complexo (1, 5, 6, 9, 13, 14, 15).

A técnica tradicionalmente utilizada para estas determinações, ao longo do tempo, tem sido a cromatografia em camada delgada (CCD), que vem sendo substituída nos últimos anos pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

¹ Recebido para publicação em 12/09/96. Aceito para publicação em 06/06/97.

² Seção de Química Biológica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

O fato das aflatoxinas estarem presentes como contaminante natural em vários produtos como milho, amendoim e ração animal e serem altamente tóxicas, especialmente a aflatoxina B₁ (AFB₁), tem havido um grande interesse no desenvolvimento de técnicas rápidas e sensíveis para detecção de AFB₁ em alimentos, rações e fluidos biológicos. Pesquisas iniciadas nos anos 70, tiveram como objetivo a aplicação de métodos imunquímicos para detectar AFB₁ e outras micotoxinas, procedimentos comumente utilizados em laboratórios de análises clínicas (2).

Estes métodos envolvem a competição entre a micotoxina livre no extrato da amostra (ou padrão) e a toxina fixada no placa pelos sítios de ligação do anticorpo. Ao estabelecer o equilíbrio de ligação a quantidade de anticorpo que se ligou à toxina fixada depende da quantidade da toxina presente na amostra (ou padrão). Caso não haja toxina livre presente, haverá um máximo de ligação entre o anticorpo e a toxina fixada e, o contrário, se o nível de toxina livre é alto, esta se ligará ao anticorpo e haverá uma redução na ligação com a toxina fixada. A determinação da quantidade de anticorpo ligado à toxina fixada se realiza pela adição de um segundo anticorpo. Este está conjugado com uma nova enzima que permite quantificá-lo pela realização de uma reação colorida com um substrato específico (7).

Nos últimos anos vem aumentando a aceitação pelas técnicas de imunoenaios, tanto para a detecção qualitativa, que é rápida, como na determinação quantitativa de micotoxinas (8,11).

Atualmente está disponível no comércio um grande número de kits que utiliza esta técnica, sob várias formas, para determinar não só aflatoxinas, mas também zearalena, ocratoxina A, deoxivalenol, toxina T-2 e fumonisinas B₁ e B₂ (7,8).

O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de dois kits disponíveis no mercado, que consistem em testes de triagem para detecção de aflatoxina B₁ em duas concentrações definidas: 5 e 20 ppb. Esta avaliação foi realizada utilizando o método de rotina de nosso laboratório que é o descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (15).

2 — MATERIAL E MÉTODOS

2.1 — Material

Foram analisadas 53 amostras enviadas à Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz para a detecção de aflatoxinas.

Estas amostras estavam assim distribuídas: 8 amostras de milho; 20 amostras de amendoim cru em grão; 20 amostras de derivados (produtos à base) de amendoim; 5 amostras de ração para peixe.

2.2 – Métodos

Foram utilizados dois métodos:

- Método descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (15) que utiliza cromatografia em camada delgada (CCD). A identidade das AFB₁ e AFG₁ foi confirmada primeiramente por cromatografia bi-dimensional e posteriormente pela formação de derivados específicos com ácido trifluoroacético (11).
- Imunoensaio utilizando kit de modelo "CITE PROBE"™ Aflatoxin Test Kit-IDEXX". Este kit foi desenvolvido pela IDEXX Corporation, Portland, ME04101, Estados Unidos. Trata-se de kit ELISA-placa para triagem de aflatoxinas B₁ nos níveis de 5 ppb (maior ou igual a 5 ppb) e 20 ppb (maior ou igual a 20 ppb).

Neste teste a amostra deve ser previamente triturada e homogeneizada da qual serão utilizadas 20g.

A extração é com 100ml da solução metanol-água (4:1). Do filtrado retira-se uma alíquota que é aplicada na primeira cavidade do kit. Encaixa-se então neste mesmo orifício o dispositivo de sonda, após um determinado período de tempo, que é diferente para cada kit, transfere-se o dispositivo de sonda para o segundo, terceiro e quarto orifícios. Para determinação do nível de aflatoxina B₁ deve-se observar no final, o verso do dispositivo de sonda que apresenta dois pequenos orifícios, sendo o primeiro referente ao controle e o segundo à amostra. Se a intensidade da cor azul apresentada, for a mesma nos dois orifícios ou se o orifício do controle apresentar tonalidade azul mais clara que a da amostra, significa que o resultado é negativo para o kit utilizado. Porém se o orifício referente ao controle apresentar uma tonalidade de azul mais escura que a da amostra, significa que o resultado é positivo, superior a 5 ou 20 ppb, isto de acordo com o kit utilizado.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelos dois métodos são mostrados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Foi feita uma avaliação comparativa entre os dois métodos, sendo que o método de imunodosagem é um teste que permite fazer uma triagem, especificando-se a concentração de AFB₁ está acima ou abaixo da dosagem do kit utilizado (nível de concentração conhecida) que neste trabalho foi de 5 ppb (µg/kg) e 20 ppb (µg/kg), enquanto que o método que utiliza a técnica de CCD é quantitativa, com limite de quantificação de 4,0 ppb.

Comparando os resultados do kit com limite de detecção de 5 ppb e os de CCD, houve um resultado falso positivo para amostras de milho (Tabela 1), três resultados positivos falsos e um negativo falso para amostras de amendoim e seus derivados (Tabela 2 e 3). Os resultados positivos falsos indicam que o kit ELISA pode superestimar o nível de aflatoxina (4 amostras em um total de 53 amostras, 92,5% de acerto), o que demonstra a necessidade de confirmar resultados positivos. O resultado negativo falso é fácil de compreender, uma vez que foi uma amostra com apenas traços de aflatoxinas e, portanto, abaixo do limite de detecção do kit.

TABELA 1. Determinação de aflatoxina em amostras de milho utilizando técnicas de CCD e ELISA.

Técnica	CCD		ELISA	
	Amostra	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₁ teste 5ppb
1	ND	ND	-	-
2	ND	ND	-	-
3	ND	ND	+	-
4	ND	ND	-	-
5	71	47	+	+
6	ND	ND	-	-
7	ND	ND	-	-
8	ND	ND	-	-

ND = não detectado - limite de detecção do método 2,0 µg/kg (ppb)

ELISA 5 ppb + : maior ou igual a 5 ppb ELISA 5 ppb - : menor que 5 ppb

ELISA 20 ppb + : maior ou igual a 20 ppb ELISA 20 ppb - : menor que 20 ppb

TABELA 2. Determinação de AFB₁ em amostras de amendoim utilizando as técnicas de CCD e ELISA.

Técnica	CCD		ELISA	
	Amostra	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₁ - teste 5ppb
1	53	134	+	+
2	356	26	+	+
3	ND	ND	+	-
4	ND	ND	-	-
5	traços	traços	+	-
6	traços	traços	-	-
7	ND	ND	-	-
8	210	47	+	+
9	64	ND	+	+
10	ND	ND	-	-
11	ND	ND	-	-
12	108	ND	+	+
13	530	ND	+	+
14	306	ND	+	+
15	72	ND	+	+
16	14	ND	+	-
17	480	ND	+	+
18	571	ND	+	+
19	36	ND	+	+
20	21	ND	+	+

traços = menor que limite de quantificação [4,0 µg/kg (ppb)] e maior que o limite de detecção [2,0 µg/kg (ppb)]. ND = não detectado

ELISA 5 ppb + : maior ou igual a 5 ppb

ELISA 5 ppb - : menor que 5 ppb

ELISA 20ppb + : maior ou igual a 20 ppb

ELISA 20ppb - : menor que 20 ppb

TABELA 3. Detecção de Aflatoxina em amostras de derivados de amendoim.

Técnica	CCD		ELISA	
	Amostra	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₁ -teste 5ppb
1	ND	ND	+	-
2	ND	ND	-	-
3	12	ND	+	-
4	89	13	+	+
5	143	ND	+	+
6	ND	ND	-	-
7	ND	ND	-	-
8	ND	ND	+	-
9	107	40	+	+
10	143	40	+	+
11	487	70	+	+
12	12	ND	+	-
13	61	ND	+	+
14	260	ND	+	+
15	480	68	+	+
16	153	ND	+	+
17	480	ND	+	+
18	96	ND	+	+
19	229	45	+	+
20	ND	ND	-	-

ND - não detectado, limite de detecção do método: 2,0µg/kg (ppb)

ELISA 5 ppb + : maior ou igual a 5 ppb

ELISA 5 ppb - : menor que 5 ppb

ELISA 20ppb + : maior ou igual a 20 ppb

ELISA 20 ppb - : menor que 20 ppb

TABELA 4. Detecção de aflatoxina em amostras de ração para peixe, artificialmente contaminadas.

Amostras	CCD-afl. B ₁	5ppb	20ppb
1	ND	-	-
2	ND	-	-
3	ND	-	-
4	ND	-	-
5	45	+	+

ND - não detectado, limite de detecção do método: 2,0µg/kg (ppb)

ELISA 5 ppb + : maior ou igual a 5 ppb

ELISA 5 ppb - : menor que 5 ppb

ELISA 20ppb + : maior ou igual a 20 ppb

ELISA 20 ppb - : menor que 20 ppb

Em relação ao kit com limite de detecção de 20 ppb, houve seis resultados negativos falsos para amostras de amendoim e seus derivados. Todos estes resultados, po-

rém, podem ser explicados pelo fato que a concentração de aflatoxinas nestas amostras variou de traços a 14 ppb, portanto, abaixo do limite de detecção do kit.

Neste trabalho os resultados não foram avaliados estatisticamente uma vez que o teste ELISA utilizado era de triagem.

A boa correlação entre os resultados de CCD e ELISA foi confirmada por HONGYO *et al.* (3) quando compararam o desempenho de um teste ELISA com CCD e CLAE para determinação de AFB₁ em milho contaminado e ração. Os resultados obtidos indicaram boa correlação entre os três métodos analíticos. A principal aplicação de ELISA é como teste rápido de triagem para verificar a presença ou ausência de uma micotoxina em particular num determinado produto. Tem sido observada boa correlação desta técnica com métodos convencionais, como CCD e CLAE, em muitos casos. Alguns poucos kits ELISA tem sido avaliados em estudos colaborativos interlaboratoriais (12).

HORWITZ *et al.* (4) avaliaram os parâmetros de precisão através de dados provenientes de um estudo colaborativo para detecção de micotoxinas utilizando CCD, CLAE e ELISA. De acordo com os resultados obtidos os autores verificaram uma precisão insatisfatória entre os laboratórios participantes deste estudo. A precisão dos métodos CCD e CLAE foi praticamente a mesma, mas quanto à ELISA foi um pouco menor.

Estes kits atendem às necessidades da indústria, pois a técnica de imunoensaio é um teste rápido e simples que permite verificar a qualidade da matéria-prima que está sendo adquirida, quanto à presença de AFB₁. A detecção de AFB₁ por outros métodos seja CLAE ou CCD requer limpeza por partição líquido-líquido ou coluna cromatográfica, que dispende muito mais tempo de análise.

Atualmente encontram-se no mercado testes de ELISA que quantificam os teores de micotoxinas nos produtos através de equipamento específico (leitor de ELISA) para leitura das diferentes intensidades de coloração desenvolvidas pelas amostras.

4 — CONCLUSÃO

- Pelos resultados obtidos podemos concluir que a utilização dos kits se mostrou adequada para a determinação de AFB₁ nos diferentes tipos de amostra analisadas de modo geral.
- Entre as vantagens do uso dos kits estão a facilidade de operação, rapidez, o uso de pouca vidraria e de pequenos volumes de solventes orgânicos, não requerendo equipamento especial e com menor exposição do analista a reagentes tóxicos. Ficando a critério do usuário a escolha do método a ser utilizado de acordo com o nível de precisão e o propósito requeridos. A maior utilidade destes kits ELISA parece ser no campo, armazéns e indústrias que precisam fazer uma triagem rápida para aceitar ou rejeitar determinado produto ou lote.
- Como os kits testados são limitados a dois níveis de concentração (5 e 20 ppb), não determinando níveis exatos de contaminação das amostras, eles não podem ser utilizados nas análises para vigilância sanitária. Os laudos emitidos para fiscalização devem explicitar valores de aflatoxinas B₁ e G₁ presentes nas amostras para

desta forma atender à exigência da Legislação Brasileira, Resolução 34/76 da CNNPA que determina limite máximo de 30µg/kg (ppb) na somatória das aflatoxinas B₁ e G₁.

– O presente estudo demonstra a importância do kit ELISA como teste de triagem para presença de AFB₁ em amostras de milho, amendoim e produtos e rações, lembrando que este kit é originalmente indicado somente para amostras de milho, porém pode ser utilizado com sucesso nas outras amostras utilizadas neste estudo, fazendo-se sempre necessário testes confirmatórios usando técnicas diferentes, uma vez que observou-se que técnicas de imunoenensaio - ELISA - algumas vezes produzem resultados positivos falsos.

5 — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) CHAMBON, P.; DANO, S.D.; CHAMBON, R. & GEACHAN, A. Rapid determination of aflatoxin M₁ milk and milk products by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 259(2): 372-374, 1983.
- (2) CHU, F.S.; UENO, I. Production of antibody against aflatoxin B₁. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:1125-1128,1977.
- (3) HONGYO, K.I.; ITOH, Y.; HIFUMI, E.; TAKEYASU, A. 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. *J. AOAC Internat.*, 75(2): 307-312, 1992.
- (4) HORWITZ, W.; ALBERT, R.; NESHEIM, S. Reliability of mycotoxin assays - an update. *J. AOAC Internat.*, 76(3): 461-491.1993.
- (5) LANSDEN, J.A. Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 964-966, 1986.
- (6) LANSDEN, J. A. Liquid chromatographic analysis system for a cyclopiazonic acid in peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67: 728-731. 1984.

- (7) MORGAN, M.R.A.; KANG, A.S. & CHAN, H.W.S. Aflatoxin determination in peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Sc., Food Agric.*,37: 908-914,1986.
- (8) PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N. & SUTKINO, . Immunological assays form mycotoxin detection. *Food Technology*, 49(2): 120-128. 1995.
- (9) PONS, W.A. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62: 586-594,1979.
- (10) PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates. *J. Assoc Off. Anal. Chem.*, 58: 163-164, 1975.
- (11) SCOTT, P.M. Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern.*,76:112, 1993.
- (12) SCOTT, P.M. Recent developments in methods of analysis for mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry* 12(9): 373-381. 1993.
- (13) SCOTT, P.M.; LAU, P. & KANHERE, S.R. Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 1364-1371. 1981.
- (14) SHANNON, G.M.; SHOTWELL, O.L. & KWOLEK, W.F. Extraction and thin layer chromatography of aflatoxin B₁ in mixed feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66: 582-586, 1983.
- (15) SOARES, L.V.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72(1):22-26,1989.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à IDEXX através de Marcel Lincoln L. Duarte pelo fornecimento dos kits ELISA utilizados neste estudo.