

Análise de contaminação por aflatoxina em farinhas de 6 variedades de trigo, pelo método de ELISA

Ricielly Eloyze Rosseto¹, Robson Michel Delai¹

¹Faculdade Assis Gurgacz – FAG, Curso de Agronomia. Avenida das Torres n. 500, CEP: 85.806-095 Bairro Santa Cruz, Cascavel, PR.

riciellyeloyze@hotmail.com, robson@fag.edu.br

Resumo: As farinhas de trigo utilizadas em preparos domésticos e industriais podem servir de veículo para a contaminação de aflatoxina, a qual tem recebido grande atenção por apresentar efeitos carcinogênicos em animais e agudo tóxico em humanos. O monitoramento da contaminação por esta micotoxina através de análises se torna necessário, pois a presença do fungo no alimento pode não implicar, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. Vários métodos podem ser utilizados para a determinação de aflatoxinas em alimentos, dentre eles o método de ELISA, o qual vêm contribuindo para a otimização do monitoramento da qualidade de alimentos, devido a sua praticidade, rapidez e custo reduzido, quando comparado à outros métodos. O presente trabalho teve o objetivo de identificar os níveis de contaminação de aflatoxina presentes em farinhas de trigo de 6 variedades a serem disponibilizadas pelo laboratório de trigo da FAG, através do método de ELISA, com teste Veratox, e viabilizar esta metodologia como alternativa para análise em farinhas de trigo em pequena escala. Os resultados obtidos demonstraram a presença de contaminação de aflatoxina em 3 amostras das seis examinadas, porém acima do permitido pela legislação apenas duas destas amostras.

Palavras chave: aflatoxina B1, B2, G1, G2; farinhas, micotoxinas.

Analysis aflatoxin contamination of flours of wheat varieties 6, by ELISA

Abstract: The wheat flour used in household and industrial preparations can serve as a vehicle for aflatoxin contamination, which has received great attention due to its carcinogenic effects in animals and acute toxicity in humans. The monitoring of patulin through analysis is necessary, because the presence of the fungus in food can not imply necessarily in mycotoxin production, as well as the toxin may be present in the feed even in the absence of the fungus. Several methods can be used for the determination of aflatoxins in foods, including the ELISA method, which are contributing to the optimization of monitoring the quality of food, due to its convenience, speed and low cost compared to other methods. This study aimed to identify the contamination levels of aflatoxin present in wheat flours of 6 varieties to be made by the laboratory wheat FAG, by ELISA, with Veratox test, and enable this methodology as an alternative to analysis in wheat flour on a small scale. The results showed the presence of aflatoxin contamination in three of the six samples examined but more than those permitted by law only two of these samples.

Key words: aflatoxin B1, B2, G1, G2; flour, mycotoxins.

Introdução

O consumo humano de alimento contaminado por micotoxinas é uma questão preocupante para a saúde pública no mundo. A contaminação dos alimentos pode ocorrer

durante várias etapas da cadeia produtiva, no campo, antes e após a colheita, durante o transporte e armazenamento do produto. O monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas é essencial para se estabelecer ações de vigilância sanitária (Caldas *et al.*, 2002).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, de baixo peso molecular. Apresentam toxicidade para o homem e outros vertebrados, além de alguns invertebrados, plantas e microrganismos (Bennett e Klich, 2003). Os efeitos biológicos produzidos pela ação das micotoxinas estão relacionados a fatores como dosagem, duração da exposição e combinação entre as toxinas. As micotoxinas afetam principalmente o fígado e seu complexo sistema enzimático, trazendo sérios problemas para a saúde humana e animal (Micotoxinas, 2009).

O desenvolvimento dos fungos e consequente produção de micotoxinas, ocorrem devido a condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redutor (Pereira *et al.*, 2002). As farinhas de trigo utilizadas em preparos industriais e domésticos podem servir de veículo para vários tipos de contaminantes, inclusive de micotoxinas (Pereira e Chang, 1993). Por este motivo, a farinha de trigo deve receber atenção especial quanto ao nível de contaminação por estas toxinas.

A aflatoxina em comparação com outras micotoxinas tem recebido grande atenção devido aos efeitos carcinogênicos que pode provocar em animais e o seu efeito agudo tóxico em humanos. As aflatoxinas representam o grupo de micotoxinas com maior incidência em alimentos já relatados (Pereira *et al.*, 2002). A aflatoxina segundo Midio (2000) é produzida pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os quatro principais metabólitos são identificados como B1 e B2 (por apresentarem fluorescência violeta, quando observadas sob luz ultravioleta em 365 nm) e G1 e G2 (por apresentarem fluorescência esverdeada). Entretanto, a aflatoxina B1 é geralmente predominante, sendo também a mais tóxica (Micotoxinas Online, 2011).

A acumulação da aflatoxina depende das condições climáticas. Antes da colheita, o desenvolvimento da aflatoxina é maior durante o período de seca. Quando a umidade do solo está abaixo do normal e as temperaturas são elevadas, o número dos esporos do *Aspergillus* no ar aumenta. Estes esporos infectam as colheitas nas áreas danificadas pelos insetos e o tempo austero. Uma vez infectada, ocorre o stress da planta e a produção da aflatoxina é favorecida. Durante o estágio pós-colheita, a proliferação da aflatoxina pode aumentar especialmente nos produtos susceptíveis e sob algumas condições de armazenamento tais como o ambiente quente e úmido. O processamento comercial dos produtos crus que fazem

uso de procedimentos de purificação incluindo a remoção de partículas quebradas ou danificadas, moagem e seleção, pode reduzir consideravelmente a concentração de aflatoxina (Fernandes, 2007).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos limites máximos em alimentos são estabelecidos na legislação. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA estabeleceu limites para 14 categorias de alimentos comercializados no Brasil, com um cronograma que entra em vigor imediatamente e vai até janeiro de 2016, de acordo com o risco sanitário envolvido para cada uma das micotoxinas, onde o LMT= Limite máximo tolerado de aflatoxinas totais para o trigo (soma de Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, segundo a RDC 07/2011 da ANVISA é de 5 µg/kg (Brasil, 2011).

Devido a presença do fungo no alimento não implicar, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina poder estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo (Diniz, 2002), as análises são necessárias para o monitoramento da contaminação. Assim, conhecer a extensão dessa contaminação poderá fornecer subsídios para os diversos segmentos envolvidos com a produção, utilização e importação de trigo, bem como fiscalização e pesquisa (Domingues *et al.*, 2007).

Vários métodos podem ser realizados para a determinação de aflatoxinas, dentre eles: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e imunoensaios (ELISA, BIOSSENSORES, SIIA) (Amaral e Júnior, 2006).

Embora a cromatografia em camada delgada fora frequentemente utilizada no passado, a cromatografia líquida de alta eficiência do inglês HPLC (High Performance Liquid Chromatography) como é comumente conhecida, tem sido utilizada nos últimos anos devido a sua facilidade de operação e melhor quantificação. A maioria dos métodos de HPLC publicados até à data têm utilizado HPLC de fase reservada em C18 fases ligadas, em que as aflatoxinas são separadas por sua hidrofobicidade (Barbas *et al.*, 2005). Diante algumas desvantagens tais como, alto custo do equipamento, alto custo de manutenção, entre outras, esta metodologia torna-se inviável para análises em pequena escala de farinhas de trigo.

No entanto, os imunoensaios vêm desempenhando um papel muito importante na análise de micotoxinas, pois disponibilizam um leque de métodos que podem ser utilizados tanto nos laboratórios como ensaios quantitativos, como no campo, para triagem (Ono *et al.*, 2004).

O ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), ensaio imunoenzimático em suporte concreto, é um método fundamentado no princípio de interação específica entre anticorpo/antígeno para aflatoxina (Zheng *et al.*, 2006). Conforme Amaral e Júnior (2006) o

método divide-se em 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. Devido a sua praticidade, rapidez e custo reduzido, o ELISA vêm contribuindo para a otimização do monitoramento da qualidade de alimentos. (Amaral e Júnior, 2006; Who, 2001; Zheng *et al.*, 2006).

Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de identificar os níveis de contaminação por aflatoxina presentes em farinhas de trigo de 6 variedades, observando se estes produtos caso contaminados se enquadram no limite de detecção permitido pela ANVISA, através do método de ELISA e viabilizar esta metodologia como uma alternativa para análises em pequena escala de farinhas de trigo.

Material e Métodos

As análises deste trabalho foram realizadas nos Laboratórios de Análises Clínicas, Microbiologia e Laboratório de Análises Reológico de Farinha de trigo, da Faculdade Assis Gurgacz, FAG - Cascavel-PR, no período de junho de 2012. Foram avaliadas as farinhas de 6 variedades de trigo disponibilizadas pelo laboratório de trigo da FAG denominadas respectivamente de A1, A2, A3, A4, A5 e A6.

Foram coletadas amostras de grãos de trigo em unidades receptoras no sudoeste do Paraná, compreendendo três municípios. O local de coletas eram silos de armazenagem. Após a coleta foram realizados testes de aflatoxina nas amostras. Para a transformação em farinha as amostras de trigo foram submetidas ao processo de umidificação. Pesou-se a quantidade de 1,5 kg de grãos por amostra, selecionou-se mil grãos e observou-se a umidade em termobalança. Os dados foram adicionados em uma planilha Excel e verificou-se a porcentagem de água a ser adicionada para umidificação na moagem. A amostra ficou em repouso por 18 horas, e logo após a mesma passou pelo processo de moagem no moinho de disco, resultando em farinha, sêmola e farelo.

Para a análise de aflatoxina B1 B2, G1 G2, foi utilizado um kit ELISA, indicado para a análise quantitativa de aflatoxina em grãos selecionados e commodities. A limitação do kit para aflatoxina restringe-se a 5- 50 ppb. Medições precisas de aflatoxina acima de 50 ppb devem ser obtidas efetuando uma análise suplementar envolvendo um extrato diluído. O limite de detecção é de 1,4 ppb.

O KIT comercial VERATOX AFLATOXIN TEST KIT, foi utilizado para o ensaio imunoenzimático por adsorção direta competitiva no formato de microplacas divididas em cubetas, que permite a obtenção de concentrações exatas expressadas em partes por bilhão

(ppb). Este teste permite que a aflatoxina livre de amostras e controles entre em competição com a aflatoxina enzima/marcada (o conjugado) pelos sítios de adsorção dos anticorpos. Depois da lavagem, se agrega ao substrato que reage com o conjugado adsorvido para produzir a coloração azul. Quanto mais cor azul, significa menos aflatoxina.

A análise é feita através de um microleitor de placas de Elisa, que responde a densidades ópticas V visível e U visível. O comprimento de onda discriminado para a utilização do Kit é de 720nm (nanômetros). Quando as densidades óticas dos controles formam uma curva típica, se traça um gráfico das densidades óticas da amostra contra as da curva para calcular a concentração exata de aflatoxina.

O teste de ELISA competitivo direto fornece concentrações exatas em partes por milhão (ppm). Amostras livres de aflatoxina e os controles concorrem com aflatoxina marcado com enzima (conjugado) para os locais de ligação aos anticorpos.

Após uma etapa de lavagem, o substrato reage com o conjugado para produzir a cor azul. Um leitor de ELISA é utilizado para reproduzir as densidades óticas. As densidades óticas da curva padrão e as densidades óticas das amostras são plotadas contra a curva para calcular a concentração exata de aflatoxina.

A metodologia consistiu em primeiramente, na extração da amostra, diluindo 10 g da amostra (farinha ou trigo moído) em 200 ml de água destilada, homogeneizando por aproximadamente 3 minutos. Esta solução foi filtrada em papel filtro nº1 e o filtrado transferido para placas de petri e identificadas. A segunda etapa consistiu no procedimento propriamente dito, onde se adicionou 100 µl do reagente “conjugado” nos micropoços vermelhos, em seguida 100 µl dos padrões: 0ppb, 5ppb, 15ppb e 50ppb nos primeiros micropoços e nos demais 100 µl de cada amostra. Então pipetou-se e soltou-se por três vezes para homogeneizar as amostras. Foram transferidos 100 µl das amostras dos micropoços vermelhos para os transparentes e deixados por 10 minutos em temperatura ambiente. Descartou-se a amostra dos micropoços e lavou-se com água destilada por 5 vezes com o auxílio de uma pisseta. Retirou-se o excesso de água com papel absorvente. Adicionou-se 100 µl de “substrato” para os micropoços lavados e secos e deixou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 100 µl do reagente “stop” e foi feita a leitura no equipamento que acompanha o kit (NEOGEN, 2009; HEXIS CIENTÍFICA, 2009).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos e representados na Figura 1 demonstram a presença de contaminação de aflatoxina em 3 amostras das seis examinadas, que amostras contaminadas

com aflatoxina, porém acima do permitido pela legislação apenas as amostras A3 e A6. A Relação umidade toxina também é visível visto que nas amostras A3 e A6 este abaixo da média. Quando se comparado ao peso de mil grãos, todas as variedades estiveram dentro dos padrões exigidos, apresentando em média 33,5 gramas. Os danos causados por fungos se manifestam através da redução do rendimento de grãos; redução do peso hectolitro; diminuição do teor de proteína nos grãos afetando a taxa de extração da farinha; redução do poder germinativo e do vigor das sementes.

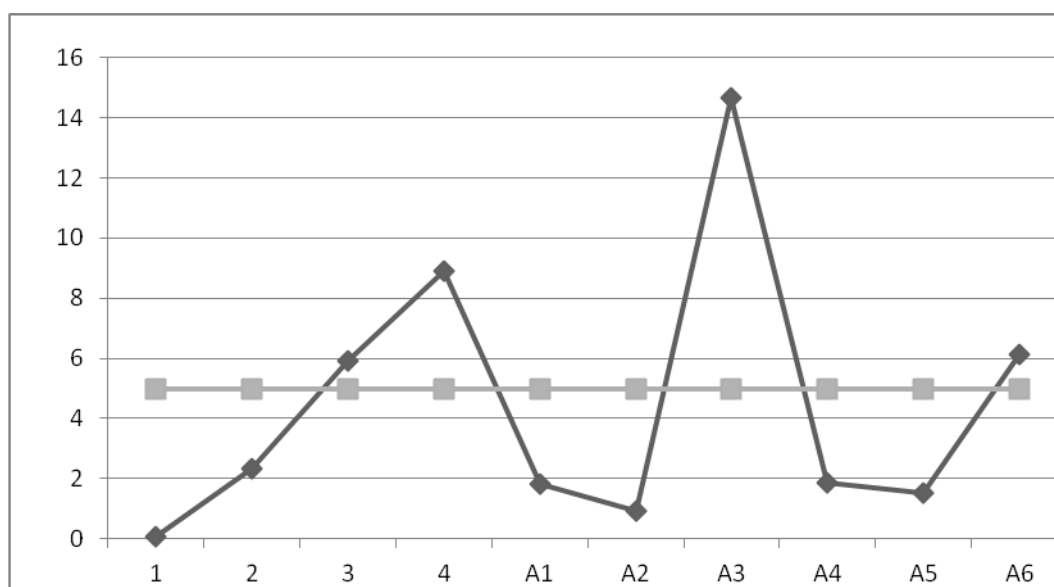


Figura 1 – Concentração de aflatoxina, segundo teste Elisa/Veratox, em seis variedades de trigo. No eixo Y a concentração em ppb de Aflatoxina e no eixo X na linha negra nos números 1, 2 3 e 4 correspondem a curva de calibração do padrão do teste e nas letras A1 até A6 correspondem as amostras das 6 variedades. Linha cinza representa a tolerância permitida pela legislação brasileira (5ppb).

Conclusões

A presença de aflatoxinas em grãos e alimentos tem sérias implicações na saúde humana e animal. Inúmeros casos de neoplasias em humanos podem estar diretamente relacionados à alimentação e à presença de aflatoxinas na dieta. A melhor forma de prevenção da contaminação de alimentos são as boas práticas agrícolas, transporte e armazenagem, além de uma legislação que assegure a qualidade dos produtos tanto de origem vegetal como animal. Assim, é necessário um trabalho conjunto entre produtores, indústria e a vigilância sanitária, de forma a contribuir com a caracterização dos fatores de risco à saúde humana em relação à contaminação dos alimentos por aflatoxinas.

Referências

- 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.
- BARBAS, C.; DAMS, A.; MAJORS, R.E. **Separation of Aflatoxins by HPLC**. Environmental, Food Safety. Agilent Technologies. USA, 2005.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin. Microbiol. Rev.** v.16, n.3, p. 497–516, 2003.
- BRASIL, Resolução ANVISA RDC nº 07 de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, 22 de fevereiro de 2011.
- CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. Brasília: **Revista Saúde Pública**, 36 (3): 319-323, 2002.
- DOMINGUES, M.A.C.; ALMEIDA, R.R.DE.; TOMIWAKA, M.M.; GALLO, C.R.; GLORIA, E.M.DA.; DIAS, C.T.S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 27(1), 181-185(2007).
- DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. Livraria e Editora Rural. 181p. 2002.
- FERNANDES, R.R.G.; **MICOTOXINAS: a situação actual da legislação e metodologias analíticas**. Universidade de Aveiro. Departamento de Química, 2007.
- Micotoxinas: **As Micotoxinas**. São Paulo: Food Ingredients Brasil, n. 7, 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com>. [2009 set. 05].
- Micotoxinas Online. Prof. Dr. Homero Fonseca. <http://www.micotoxinas.com.br/currichf.htm> **Informações básicas e recentes na área das micotoxinas.** Piracicaba – SP. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/aflatoxina.htm>. 2011.
- MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela. 2000.
- ONO, E.Y.S.; MENDES, A.M.; MEIRELLES P.G.; HIROOKA, E.Y.; ONO, M.A. Micotoxinas em alimentos: progressos na imunodeteção. **Biotec. Cien. Desen.** v.32, p.69-80, 2004.
- PEREIRA, M.L.; CHANG, Y.K. Contaminantes do trigo e farinha e medidas de sanitização na indústria de moagem e panificação. **Higiene Alimentar**, v. 7, n. 26, p. 20-29, 1993.
- PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. Ceppa**. v.20, n.1, p.141-156, 2002.
- Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE**. Disponível em< <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Aflatoxinas.htm>>.

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.

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