

μBiossíntese e quantificação de aflatoxinas B1 em grãos de milho, arroz e sorgo inoculados com *Aspergillus flavus* através da técnica ELISA

CÉSAR H. LÚCIO¹, NICÉSIO F J PINTO³, EMANUELA M. SOARES², IVANILDO E. MARRIEL³

¹UNI-BH, ²PUC Minas; ³Embrapa Milho e Sorgo, 35700-000, Sete Lagoas - MG, Brasil; E-mail: imarriel@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: fungo, determinação de micotoxinas, cereais, método rápido

Introdução

As aflatoxinas constituem uma das classes de micotoxinas que ocorrem naturalmente em commodities agrícolas. Os cereais tornaram-se importantes para o agronegócio brasileiro, principalmente, em razão de seu papel como ingredientes na agroindústria de rações para suínos e aves, que contribuem de modo significativo para a pauta de exportação brasileira.

As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários quimicamente diversos produzidos por diferentes espécies de fungos, principalmente, dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Penicillium*, sendo as mais comuns: aflatoxinas, ochatoxina A, fumosinas, tricotecenos e zearalenonas (CHEEKE & SHULL, 1985; GILBERT & VARGAS, 2003). Essas substâncias produzem uma ampla gama de efeitos tóxicos e adversos à saúde animal, inclusive humana (CAST, 2003). Em suínos, a intoxicação com aflatoxinas resulta em perda de peso, redução da conversão alimentar e imunodepressão, (MALLMANN et al., 1994; SANTOS et al, 1986) e, em aves, em menor ganho de peso e menor consumo de ração, menor produção e peso dos ovos, podendo resultar em morte dos animais, ocasionando grandes perdas econômicas para o agronegócio e riscos para a saúde humana (Caldas et al., 2002).

Entre os 18 tipos diferentes de aflatoxinas produzidas na natureza, a aflatoxina B1 (AFB1) é considerada a de maior toxicidade, sendo produzida principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. parasiticus* (SMITH & ROSS, 1991; DUTON, 1988). Os alimentos e ingredientes utilizados nas dietas de animais são contaminados com aflatoxinas antes da colheita, durante o tempo entre colheita e secagem e durante o período de armazenamento (WILLIAM, 1991; PRADO et al., 1995).

Atualmente, existem normas regulatórias para as principais micotoxinas em pelo menos 100 países, na maioria dos casos para aflatoxinas, sendo os níveis de tolerância máxima bastante variáveis (VAN EGMOND & JONKER, 2003). Zheng et al, (2006) citam que, nos USA, os alimentos em geral devem apresentar valores máximos de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto para os componentes de ração, esses valores variam de 100 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$, dependendo do produto, finalidade e idade de animais.

No Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde, o limite de tolerância varia entre 20 e 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para aflatoxinas totais em alimentos e matéria prima para rações, respectivamente. Portanto, torna-se necessário o monitoramento da presença de AFB1 para garantir a eficácia das medidas de segurança alimentar, o alcance de metas logísticas e operacionais da indústrias e a circulação rápida de

commodities e produtos através dos mercados, economizando tempo e custo (SCANLAN, 2005).

Os métodos analíticos convencionais para micotoxinas incluem cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de alta resolução e cromatografia gasosa (GILBERT & VARGAS, 2003; ZHENG et al., 2006), mas em razão de extensas etapas na preparação das amostras antes da análise, as vezes, torna-se limitada sua aplicação prática (COTY, 1998). Como alternativas, tem sido utilizados métodos imunológicos, considerados rápidos, e barato. Dentre esses métodos, a técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), que inclui testes diversos, tem sido utilizada por mais de uma década em análises de micotoxinas (CHU, 1996), principalmente os testes competitivos (RAMARISHMA & MEHAN, 1993). Esta tecnologia baseia-se na habilidade de um anticorpo específico para distinguir a estrutura tridimensional de uma micotoxina específica.

Como vantagens, os testes baseados na técnica ELISA podem ser quantitativos, simples, específicos, sensíveis e requerem pequenos volumes de amostras, e exigem procedimentos simples de extração, comparados métodos analíticos convencionais, permitindo processamento de um grande número de amostras em tempo relativamente curto.

Objetivos

Adaptar e avaliar o teste ELISA indireto não competitivo para detecção e quantificação de aflatoxina B1 em cereais

Avaliar a influência do tipo de grão sobre a produção de aflatoxina B1

Material e Métodos

Cultura de *Aspergillus flavus* nos grãos e meio de cultura: O isolado de *Aspergillus flavus* do banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Sol da Embrapa Milho e Sorgo foi cultivado em meio ágar-batata durante 10 dias à temperatura ambiente. A partir das placas, foi preparada uma suspensão de micélios e esporos, pela adição de PBS. Cinco ml de suspensão foi utilizada para inocular 150 g de grãos de milho, sorgo e de arroz, previamente desinfestados com cloramina T 1%, contidos em erlenmeyers de 500 ml. No caso do meio de cultura, 50 ml de caldo tripticaseína de soja, em erlenmeyers de 125 ml, foram inoculados, foram com 1 ml da suspensão de fungos. Em ambos os casos, utilizaram-se três repetições.

Preparação dos Extratos: Após 12 dias de incubação dos erlenmeyers, amostras de 10g de grãos (milho, arroz e sorgo) tratados com a suspensão do fungo foram trituradas em cadinhos de porcelana, em 50 ml de metanol 70% em solução de KCl 0,5%. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 6000 x g, durante 6 minutos e filtradas em papel watmann, nº4. O sobrenadante foi mantido a -18°C. Foram analisadas quatro repetições de cada amostra.

ELISA indireto não competitivo: basicamente, as placas ELISA contendo 100 ul de cada extrato (ou solução de aflatoxina pura) por cavidade foram incubadas durante a noite, 37°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3x com PBS-T e tratadas com PBS caseína durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente de modo similar e 100 ul de solução de antissoro monoclonal anti AFB1 (sigma) na diluição 1:5000 foram aplicados por cavidade. Após duas horas a temperatura ambiente e lavagem das placas, foram aplicados, em cada cavidade, 100 ul do conjugado fosfatase- anti-IgG de camundongo,

diluída 1:3000 em PBS-T. Incubou-se novamente por duas horas a temperatura ambiente. Após a lavagem final, foram adicionados 100 μ l da solução do substrato, p-nitrofenol fosfato (1mg/ml) e a reação foi determinada pela leitura de absorbância a 405 nm.

Ajustes de concentrações ótimas dos extratos: Cinco diluições de cada extrato (1:5, 1:10, 1:20; 1:40 e 1:80) em tampão de carbonato de sódio, em duplicats, foram utilizadas como antígenos para sensibilização das placas ELISA e condução das reações como descrito acima.

Ajustes de concentrações ótimas dos reagentes e limite de detecção de AFB1: As concentrações de AFB1 (1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 200, 200, 400 e 800 μ g kg^{-1}) preparadas com AFB1 padrão (sigma) foram avaliadas como antígeno no teste ELISA indireto em combinação com as seguintes concentrações de antissoro anti AFB1 (diluições 1:2500, 15000, 1:10000, 1:20000; 1:30000; 1:40000 e 1:50000). As reações foram conduzidas como descrito no teste ELISA indireto.

Estimativa das concentrações de AFB1 nos extratos: A curva padrão para se estimar as concentrações de AFB1 foi feita partir da preparação de sete concentrações (0, 5,10,20, 80, 160, e 320 μ g kg^{-1}) de aflatoxina B1 pura (sigma). Essas soluções foram utilizadas para sensibilização das placas ELISA, de acordo com o procedimento já descrito para o teste de ELISA indireto. Foram analisadas nove repetições de cada amostra. As leituras obtidas foram utilizadas para cálculo e ajuste da curva padrão.

Resultados e Discussão

Nos ensaios preliminares para o ajuste de concentrações ótimas dos reagentes puros para o teste ELISA indireto não competitivo, utilizando 11 concentrações do antígeno, AFB1(1 a 800 μ g kg^{-1}) combinadas com 8 concentrações do antissoro anti-AFB1 (diluição1:2500 a 1:50000), foram detectadas reações positivas em todos os casos e indicaram a diluição 1: 5000 como a mais adequada para os bioensaios de biossntes e de quantificação da produção de AFB1. Os resultados destes testes indicaram ainda um limite de detecção abaixo de 5,0 μ g kg^{-1} , o que mostra o potencial deste método para o monitoramento da produção de AFB1, considerando-se o nível de tolerância no Brasil entre 20 e 30 μ g kg^{-1} Esses resultados são consistentes com os relatados por (WANG et al., 2006), que relatam limite de detecção de até 1,0 μ g kg^{-1} em grãos utilizando o teste ELISA competitivo.

A produção de AFB1 detectada nos quatros substratos testados, apresentada na Fig. 1, foi estimada através da equação $Y=0,1343*(1-\exp(0,006128*X))$, ($R^2=0,9513^{**}$). Notam-se diferenças significativas entre os valores observados para a biossíntese de AFB1 entre as amostras em função do tipo de grãos. Foram detectados 485,9 μ g kg^{-1} em sorgo, 55,2 μ g kg^{-1} em milho e 52,4 μ g kg^{-1} em arroz e 243,0 μ g kg^{-1} em meio de cultura líquido. A menor quantidade de AFB1 detectada em arroz e milho demonstram que a presença do fungo não implica necessariamente em altas produção de AFB1, considerando-se que ocorreu crescimento acentuado do fungo também nestas amostras (não mostrado).

Vale ressaltar que o valor encontrado em meio de cultura pode estar subestimado. Neste caso, foi considerada somente AFB1 extracelular, acumulada no meio e não a acumulada na massa micelial do fungo. Sabe-se que a produção de aflatoxina micelial pode superar a encontrada em meio de cultura (Chung et al., 1989). Pode-se especular que a produção de AFB1 observada depende do isolado de fungo testado, pois a produção de

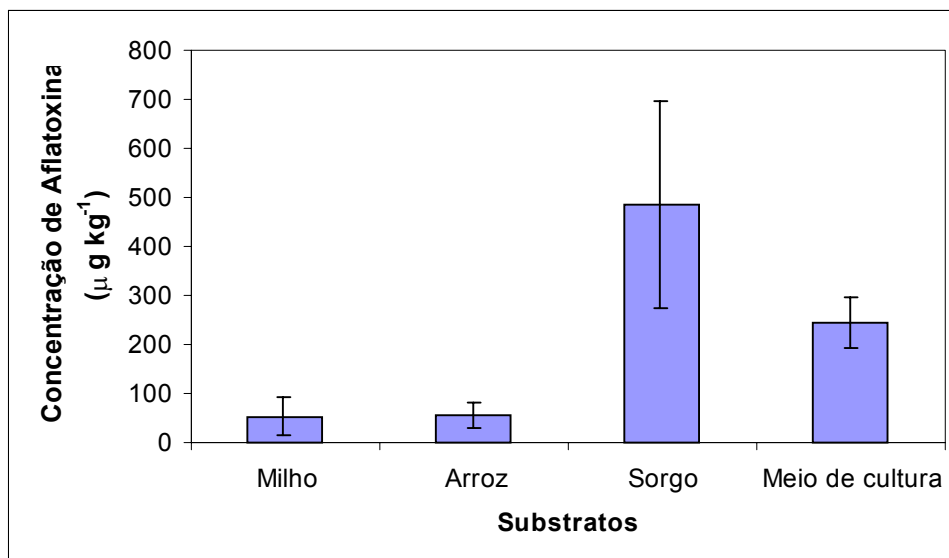


Figura 1. Biossíntese de aflatoxina B1, em cereais e em meio de cultura líquido inoculados com *Aspergillus Flavus*, detectada através do teste ELISA indireto não competitivo, após 12 de incubação à temperatura ambiente. Valores médios de quatro repetições.

esterigmatocistina (precursor da AFB1) difere entre isolados de dois fungos em até 10 vezes (CHUNG et al., 1989).

Observou-se ainda uma variação elevada entre as repetições de cada amostra reveladas pelos desvios padrão das médias (Fig 1), exceto para o meio de cultura. Neste caso, essa variação foi menor, em torno de 21%, comparados com os valores observados nas demais amostras onde se observou variação entre 43, 50 e 75% para o desvio padrão das médias, em sorgo, milho e arroz, respectivamente. Esses fatos evidenciam uma distribuição heterogênea de AFB1 nos grãos, o que implica em cuidados especiais com a amostragem em análises desta natureza. Amostragem em análise de aflatoxinas em grãos tem recebido atenção em diferentes pesquisas (WHITAKER & DICKENS, 1979; GILBERT & VARGAS, 2003).

Em razão da simplicidade, sensibilidade e rapidez do método avaliado, os resultados demonstram que o teste ELISA indireto não competitivo pode ser utilizado para a quantificação de AFB1 em cereais, permitindo análises de grande número de amostras, com custos baixos. Entretanto, para o uso rotineiro deste teste torna-se essencial e crítico a sua validação de acordo com a demanda de cada laboratório em função da natureza e tipos de amostras a serem analisadas, conforme comentado em outras pesquisas (GILBERTO & ANKLAM, 2002; ZHENG et al., 2005)

Conclusões

1. Os resultados demonstram que AFB1 pode ser efetivamente monitorada em cereais, através do método ELISA indireto não competitivo, com limite de detecção abaixo de 5,0 µg kg⁻¹.
2. Os grãos de sorgo inoculados com *Aspergillus Flavus* favorecem a biossíntese de AFB1, comparados com os de milho e de arroz.
3. A produção de AFB1 em cereais inoculados com *Aspergillus flavus* depende do tipo de grãos

Literatura citada

- CALDAS, E.D; SILVA, S, C & OLIVEIRA, J, N,. Aflatoxinas e ocrtoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana, Rev. Saúde Pública; 36: 319-323. 2002
- Cheeke, P.R. and Shull, L.R. (1985) Mycotoxins (Chap. 12). In: Natural toxicants in feeds and poisonous plants. AVI. pp393-477.
- Chu FS. Recent studies on immunoassays for mycotoxin. In:Beier RC, Stanker LH, eds. Immuassays for Residue Analysis, American Chemical Society, Washington, DC,1996:294-313.
- CHUNG D., ABOUZIED M.M, PESTKA J.J. Immunochemical assay applied to mycotoxin biosynthesis: Elisa comparison of sterigmatocystin production by *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus nidulans*. Mycopathologia 107:93-100. 1989,
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST).Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Task Force Report, No.139, CAST, Ames, Iowa,2003
- DUTTON M.F.,Enzyme and aflatoxin biosynthesis. Microbiol Rev:52:274-95. 1988
- Gilbert J, Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. Trends Anal Chem;21(6-7):468-486. 2002
- GILBERT J.,VARGAS,E.A., Advances in Sampling and Analysis for Aflatoxins and Animal Fee. ,Journal of Toxicology-Toxin Reviews, v.22 p.381-422. 2003,
- MALLMAN, C.A.,SANTURIO, J.M,WENTS L.Aflatoxinas-Aspectos Clínicos e Toxicológicos em Suínos.Ciência Rural,Santa Maria, v.24,n.3,p.635-643. 1994,
- PRADO, G, PINTO, N, J, A. & OLIVEIRA, M.S, Incidência de aflatoxina em milho(*Zea mays*L.) com diferentes níveis de umidade, após tratamento com fungicida, armazenado em atmosfera com e sem aeração, Rev. Inst. Adolfo Lutz. 1995, 55 (2): 79-84
- RAMAKRISHMA,N. & MEHAN, VK, Direct and indirect competitive monoclonal antibody-based ELISA of Aflatoxin B1 in groundnut, Mycotoxin Research, 1993, 9, 1, 53-63
- SANTOS, J.L. dos, RIBEIRO, M.F.B., SILVA, J.C.P da, . Aflatoxicose em suíno: ocorrência de surtos na Zona da Mata de Minas. Arq Brás de Méd Vet e Zoot, v.38 n.2,p.167-172,1986
- Scanlan FP. Why rapid testing? In: van Amerongen A, Barug D, Lauwaars M, eds. Rapid Methods for Biological, Chemical Contaminants in Food and Feed, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2005:19-29.
- SMITH, J.E., ROSS, K. The toxigenic *Aspergilli*. In: SMITH,J.E., ANDERSON,R.S., Mycotoxins and animals foods. Boca Raton,cap.5.p-101-118. 1991
- Van Egmond HP, Jonker MA. Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations,2004.
- WANG, Y.P.; JI, R.; JIANG,T.; KANG, W.J. Development of ELISA -kit of quantitative analysis for Zearalenone. 35(2):221-4. 2006
- Whitaker TB, Dickens JW. Variability Associated with Testing Corn for Aflatoxin. J Assoc Off Anal Chem;56:789-794. 1979
- WILLIAMS, P.C. Storage of grains and seeds in: SMITH,J.E., HENDERSON,R.S. Mycotoxins and animal foods. Boca Raton, CRC Press. Cap. 30 p.721-746.1991
- ZHENG M.Z., RICHARD J.L., BINDER J., A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. Mycopathologia 161:261-273. 2006;
- Zheng Z, Humphrey CW, King TS, Tichard JL. Validation of an ELISA test Kit for the detection of total Aflatoxins in grain and grain products. Mycopathologia, 159(2):255-263. 2005