

AVALIAÇÃO DO TESTE IMUNOLÓGICO QuickTox® NA QUANTIFICAÇÃO DE DEOXINIVALENOL EM TRIGO PARA SEGREGAÇÃO DE LOTES

Casiane Salete Tibola¹, Camila Primieri Nicolli², Piérri Spolti³, Emerson Medeiros Del Ponte⁴, José Maurício Cunha Fernandes¹

¹Eng. Agr. Dr. Embrapa Trigo - Rodovia BR 285, km 294 - Passo Fundo/RS. CEP 99001-970. E-mail: casiane.tibola@embrapa.br. ²Mestranda, Programa de pós-graduação em Fitotecnia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. ³Dr., bolsista de pós-doutorado CNPq e ⁴Dr. Professor, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Dentre os fatores que limitam a produção de trigo na região Sul do Brasil, destaca-se o excesso de umidade que favorece epidemias de doenças foliares e de espigas. A giberela, doença que ocorre na floração do trigo, afeta a qualidade e a segurança dos alimentos devido à produção de micotoxinas pelo patógeno. No Brasil, a giberela é de ocorrência frequente e causada por diferentes espécies do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (Del Ponte et al., 2013). A micotoxina mais comum é deoxinivalenol (DON), da classe dos tricotecenos, que tem limites máximos toleráveis regulados por legislação específica (ANVISA, 2011). Fatores relacionados às condições ambientais, resistência das cultivares e potencial toxigênico do patógeno influenciam decisivamente na manifestação de sintomas e acúmulo de micotoxinas, sendo a relação entre essas variáveis muitas vezes inconsistente.

As técnicas cromatográficas e imunoenzimáticas são as mais utilizadas na separação e detecção de micotoxinas (Tibola et al., 2013). A Cromatografia Líquida de Ultra-performance, associada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS), é um dos métodos multitoxinas mais robusto, sensível e preciso. Entretanto, é pouco viável para análises de rotina visando à segregação, devido ao alto custo, a demanda por equipamentos sofisticados, além de envolver procedimentos demorados e complexos (Liu et al., 2012). Dentre as alternativas, destacam-se os kits de detecção rápida como os imunoenaios competitivos, baseados na reação antígeno-anticorpo. Um dos requerimentos fundamentais em testes imunológicos é a especificidade do

anticorpo, prevenindo a reação cruzada com outros constituintes da amostra (Meneely et al., 2011). As principais vantagens dos kits de detecção, com base em leituras em ELISA ou diretamente em tiras, incluem economia, rapidez e facilidade na operação, viabilizando a detecção no ponto de coleta de amostras. As tiras contêm todos os reagentes imobilizados e apresentam a vantagem de serem portáteis. Wang et al. (2013), conduziram ensaio imunocromatográfico para detecção de ZEA e FUM B1 em amostras de milho, trigo e rações e relataram adequada correlação entre métodos cromatográficos. Outra aplicação foi na quantificação de DON, com resultados similares aos obtidos no método cromatográfico (Liu et al., 2012).

Objetivou-se avaliar o teste imunológico QuickTox[®], comparado com método de referência UPLC-MS/MS, para segregação de amostras de trigo com grande variação nos níveis de DON, provenientes de quatro cultivares inoculadas com duas espécies do patógeno, em condições controladas.

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com temperatura média de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Foram utilizadas quatro cultivares de trigo com diferentes níveis de resistência à giberela: BRS 194, considerada padrão de suscetibilidade, Quartzo, como moderadamente suscetível e BRS Parrudo e BRS 179, como moderadamente resistentes. Ambos experimentos foram conduzidos em delineamento fatorial, sendo as 4 cultivares e 3 tipos de inóculos a saber: mistura de 3 isolados *F. graminearum*, mistura de 3 isolados *F. meridionale* e mistura dos seis isolados (3 *F. graminearum* e 3 *F. meridionale*), com quatro repetições. No experimento 1 (ASP, aspersão), as espigas foram aspergidas com inóculo (10^5 esporos/ml) até o ponto de escorrimento, no estágio final de grão leitoso. No experimento 2 (EC, espigeta central), foi inoculada a espigeta central (20 µl da suspensão de esporos), na fase de florescimento pleno. No experimento ASP, foi avaliado o percentual médio de espigas doentes (INC, incidência). No experimento EC, foi avaliado o percentual médio de espigetas doentes em relação ao número total de espigetas (SEV, severidade). As avaliações foram feitas aos 15 dias, após inoculação nos dois experimentos. Nos dois experimentos foi avaliada a incidência de grãos infectados (INF), determinados em 100 grãos submetidos

ao teste de substrato de papel com incubação por 7 dias a 25 °C. A determinação de micotoxinas foi realizada pelo método referência UPLC-MS/MS. A metodologia automatizada de extração, clarificação e derivação foi conduzida com base no método descrito em Varga et al. (2012). O limite de quantificação e recuperação para DON é de 200 ppb e 94,0%, respectivamente. As tiras imunológicas (QuickTox DON[®]), com detecção através de leitora de reflectância, apresenta limite de quantificação (LOQ) de 250-5000 ppb e limite de detecção de 200 ppb. Os procedimentos de extração, calibração e leitura foram efetuados conforme protocolo do fabricante. A associação entre as variáveis de cada experimento foram analisadas pela correlação de Pearson. A concordância (acurácia e precisão) das estimativas pelas tiras imunológicas, comparada aos valores estimados pelo método de referência foram analisadas pelo coeficiente de correlação de concordância (0-1, sendo 1 o máximo de concordância), combinando-se as avaliações de ambos experimentos. Finalmente, foi avaliada a taxa de falsos positivos e negativos do teste imunológico para o limiar de 1000 e 2000 ppb, adotando-se o método de cromatografia como referência.

Os tratamentos (cultivares de trigo e espécies fúngicas) afetaram significativamente a doença e a produção de micotoxinas, o que resultou em um gradiente de incidência e severidade da doença com valores variando de nulos até um máximo de 61,8% de incidência e 11,1% de severidade, nos experimentos ASP e EC, respectivamente. A concentração de DON determinada pelo método cromatográfico foi, aproximadamente, cinco vezes mais alta no experimento ASP (média de 5.278 ppb e desvio padrão de 5.585,6 ppb), do que no experimento EC (média de 980 ppb com desvio padrão de 668,3 ppb). As correlações entre as variáveis de doença e micotoxinas foram todas positivas e significativas. No experimento ASP, a incidência de giberela apresentou maior correlação com DON estimado por UPLC ($r=0.55$) do que o percentual de grãos infectados ($r=0.43$). No entanto, essas duas variáveis de doença mostraram mais forte associação entre si ($r=0.83$). Houve forte associação entre DON estimado pelo método rápido e o método cromatográfico ($r=0.96$). No experimento EC, o padrão foi similar ao observado no experimento

ASP, porém as associações entre as duas variáveis da doença foram mais fracas ($r=0.61$). Da mesma forma, a associação entre os dois métodos de estimativas de DON foi expressiva ($r=0.95$).

Nas 32 amostras o coeficiente de correlação de concordância (ρ_c) que é o produto da precisão ($r= 0.95$) e acurácia ($C_b =0.92$), foi estimado em 0,89 (IC 95% 0.83-0.95) (Figura 1A). De maneira geral, as tiras imunológicas superestimaram DON, com erros de até 4000 ppb para 5 amostras (Figura 1C), com concentrações de DON acima de 5000 ppb, mensurado no método referência (Figura 1D). As estimativas pelo teste imunológico QuickTox[®] mostraram boa concordância com os valores de referência. No entanto, erros de grandes magnitudes foram verificados para concentrações muito altas da micotoxina. Este resultado é explicado pelo limite de quantificação (250-5000 ppb) do kit, para viabilizar a quantificação de DON no caso de amostras com concentrações superiores ao LOQ, adota-se a diluição de amostra, resultando em perda de acurácia. O kit apresentou erro de classificação em aproximadamente 10% das amostras, todos falsos positivos, o que resultaria na rejeição de um lote considerado seguro. A superestimativa de DON, no caso de testes imunológicos, é explicado devido à reação cruzada com acetilados de DON (3ADON e 15ADON), devido à ausência de etapas de limpeza e purificação na metodologia. No entanto, em nenhuma amostra o kit gerou falsos negativos, ou seja, nenhum lote com valores acima do permitido foi erroneamente classificado como seguro. Estudos futuros devem ser conduzidos com amostras de campo, para o qual o teste terá aplicação prática.

O kit QuickTox[®] pode ser utilizado como uma alternativa rápida e de alto custo-benefício na segregação de lotes de trigo, de acordo com os níveis de micotoxinas. Os resultados demonstraram boa acurácia e sensibilidade para quantificar DON, conforme níveis estabelecidos na legislação brasileira para trigo, contribuindo para a comercialização de alimentos seguros.

Referências bibliográficas

ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fev. de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, DF, 2011.
Del Ponte, E. M.; Tessmann, D. J. ; Spolti, P.; Kuhnem, P. R.; Silva, C. N. Species identification, genetic diversity and phenotypic variation studies on the *Fusarium graminearum* complex

populations from Brazil. In: Alconada Magliano, Teresa M.; Chulze, Sofia Noemi. (Org.). **Fusarium Head Blight in Latin America**. 1ed.: Springer Netherlands, 2013, v. , p. 15-29.

Liu, J.; Zanardi, S.; Powers, S.; Suman, M. Development and practical application in the cereal food industry of a rapid and quantitative lateral flow immunoassay for deoxynivalenol. **Food Control**, v. 26, p. 88-91, 2012.

Meneely, J. P.; Ricci, F.; Egmond, H. P. V.; Elliott, C. T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 192-203, 2011.

Tibola, C. S.; Fernandes, J. M. C.; Del Ponte, E. M.; Mallmann, C.A.; Dilkin, P.; Lima, M.I.P.M.; Pavan, W. Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2013. 40 p. (Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento).

Varga, E.; Glauner, T.; Köppen, R.; Mayer, K.; Sulyok, M.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Berthiller, F. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 9, p. 2675-2686, 2012.

Wang, Y.-K.; Shi, Y.-B.; Zou, Q.; Sun, J.-H.; Chen, Z.-F.; Wang, H.; Li, S. Q.; Yan, Y.-X. Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B1 in corn, wheat and feedstuff samples. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 180-188, 2013.

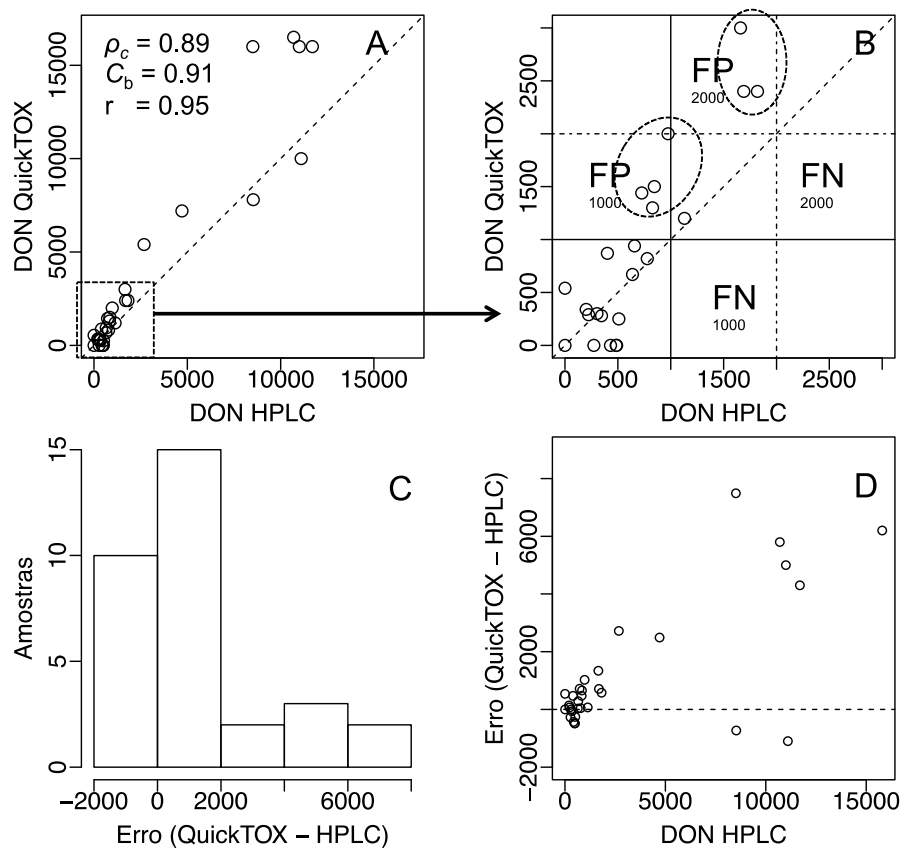


Figura 1. Relação entre concentração de micotoxina estimada pelo teste imunológico e pelo método referência, respectivas estatísticas de concordância (ρ_c), acurácia (C_b) e precisão (r) para toda a amplitude de dados (A), e apenas para os valores até 3.000 ppb, onde se observa o número de amostras nas regiões relativas à falso-positivos (FP) (B). A frequência dos erros das estimativas pelo teste imunológico (C) e a relação entre os erros e a concentração pelo método de referência (D).