VII EAITI 2017
ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
09 e 10 de novembro de 2017

VALIDAÇÃO DE IC-ELISA PARA ANÁLISE DE AFLATOXINA B_1 EM OVO

Mariana Ribeiro Benfatti (PIBITI/FA-UEL), Thaís Marques Amorim, Elisa Yoko Hirooka (Orientadora) (hirooka@uel.br)

Universidade Estadual de Londrina / Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Área Ciências Agrárias e Subárea Ciência de Alimentos

Palavras Chave: *Aflatoxina B1, ovos, ic-ELISA*

Resumo

O imunoensaio enzimático indireto competitivo (ic-ELISA) foi desenvolvido e validado para aplicação no monitoramento de aflatoxina B_1 em amostras de ovos de duas granjas. Um total de 2000 ovos foram coletados ao acaso para constituir 300 amostras, num período de 20 semanas. O ic-ELISA apresentou validação adequada para ovos, conforme demonstrado pelas taxas de recuperação entre 70 e 100% (CE n. ° 401, 2006) para amostras contaminadas com 1 a 5 ng g-1 de aflatoxina B_1. O LOD e LOQ obtidos foram adequados para o rastreio da aflatoxina B_1 no ovo, já que essa matriz apresenta baixos níveis de contaminação pela micotoxina. A precisão, expressada pela repetibilidade e precisão intermediada, apresentou coeficiente de variação (CV) menor do que o recomendado pelo INMETRO (2007) e ANVISA (2003).

Introdução

As aflatoxinas constituem um grupo de micotoxinas amplamente estudado pois apresentam efeito tóxico e carcinogênico, são produzidas pelo gênero *Aspergillus*, com ênfase a *A*. flavus, *A*. parasiticus e *A*. nominus. Os principais análogos são B_1, B_2, G_1 e G_2, sendo a aflatoxina B_1 cancerígena para o homem. Aflatoxicoses são observadas principalmente em animais. Em aves os principais efeitos são a redução na taxa de crescimento e reprodução animal, diminuição da produção de ovo, imunossupressão, anemia e carcinoma hepatocelular (LUCIOLI, 2011). Métodos como o ensaio ELISA são usados na triagem de micotoxinas em alimento, sendo um método alternativo ao uso de sistemas cromatográficos, pois necessita de processo simples de extração das amostras, garante a sensibilidade, exatidão, precisão e limites de quantificação e detecção similares aos obtidos na cromatografia (ANKLAM et.al. STROKA; BOENKE, 2002).

Material e Métodos

A extração de aflatoxina B_1 em ovo foi realizada a partir de 5 g de amostra (ovo homogeneizado) adicionada de 0,5 g de NaCl e 25 mL de solução metanol grau HPLC: H2O (70:30, v/v) e agitada a 150 rpm por 30 min, posteriormente foi filtrada qualitativamente, seguida de membrana de vidro de 0,45µm (Macherey-Nagel, Alemanha). Alíquotas de 500 µL do filtrado foram secas em banho a 40˚C sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas em 500 µL de PBST:Metanol (9:1, v/v) e diluídas 2 vezes no mesmo solvente. O imunoensaio ic-ELISA foi padronizado com 50 µL de anticorpo primário IgG anti-FB_1 diluído (1:30.000) e 50 µL de anticorpo secundário Anti-IgG-HRP (1:5.000 em PBS).

Resultados Obtidos

O ic-ELISA desenvolvido apresentou parâmetros adequados de validação para ovos, conforme demonstrado pelas taxas de recuperação de 95.5%, 98,33% e 99.2% para concentrações de 1,0; 2,0 e 5,0 ng/g de AFB_1, respectivamente, todas entre 70 e 100%, de acordo com a recomendação do Regulamento das Comunidades Europeias (CE n. ° 401, 2006) para amostras contaminadas com 1 a 5 ng g-1 de aflatoxina. A validação apresentou linearidade adequada (R^2=0,99), limite de detecção e quantificação de 0,38 ng/g e 0,71 ng/g, respectivamente. O LOD e LOQ foram adequados para o rastreio da aflatoxina B_1 no ovo,já que essa matriz apresenta baixos níveis de contaminação pela micotoxina. A precisão, expressada pela repetibilidade e precisão intermediada, apresentou coeficiente de variação (CV) inferior a 15%, conforme recomendado pelo INMETRO (2007) e ANVISA (2003).

Conclusão

O ic-ELISA desenvolvido com AcM com alta reatividade pelo análogo AFB_1 apresentou sensibilidade, precisão e robustez suficiente para aplicação como ferramenta rápida na triagem de aflatoxina na cadeia produtiva de ovos, podendo reduzir o custo da análise em um fator aproximado de 160 vezes. Além disso, o ic-ELISA padronizado mostrou linearidade, precisão e exatidão, com vantagens de especificidade para análise em material biológico, fácil de realizar e preparação rápida de amostras sem solventes orgânicos, mostrando-se promissor na triagem de aflatoxina B_1 em ovo.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, CNPq e Rede Nanobiotec-Brasil da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES-MEC.

---

[1] INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos. Revisão 02, 2007

[2] ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. Food Control, v.13, p. 173-183, 2002.

[3] LUCIOLLI, J. Efeitos sistêmicos da contaminação por desoxinivalenol, fumonisina B e sua associação em suínos. 179 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR. 2011