

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO KIT REVEAL® Q+ PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS E FUMONISINAS EM ALIMENTO PET.

EFFICIENCY EVALUATION ABOUT THE REVEAL® Q+ KIT FOR AFLATOXINS AND FUMONISINS DETECTION IN PET FOOD.

¹MIOTO-JUNIOR, P. S. M.

¹Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas –Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

RESUMO

Foi realizado a avaliação da eficiência do kit Reveal® Q+ desenvolvido pela Neogen para detecção de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂ e fumonisinas B₁ e B₂ em 26 amostras de alimento pet e 4 amostras com contaminação positiva entre 5 a 20 ppb para aflatoxinas. Ele foi comparado com a metodologia cromatografia líquida. Foram analisadas 56 amostras de alimento pet. Os resultados demonstraram boa concordância entre as duas técnicas para detecção de aflatoxinas e fumonisinas. O método desenvolvido pela Neogen mostra-se mais rápido, menos complexo, utiliza menos reagentes químicos e resultados com ótima confiabilidade, tornando assim uma ótima ferramenta para controle de qualidade e detecção de micotoxinas.

Palavras-chave: Alimento Pet. Cromatografia Líquida. Micotoxinas. Neogen.

ABSTRACT

It was realized an efficiency evaluation about the Kit Reveal® Q+ developed by Neogen for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ e fumonisins B₁ e B₂ detection in 26 samples of pet foods and 4 samples with positive contamination between 5 to 20 ppb for aflatoxins. It was compared to the liquid chromatography methodology. It was analyzed 56 samples of pet food. The results demonstrated a good concordance between these two techniques for aflatoxins and fumonisins detection. The method developed by Neogen shows faster, less complex, uses less chemistry agents and results with great confiability, becoming it a great tool for quality control and mycotoxins detection.

Keywords: Pet food. Liquid Chromatography. Mycotoxins. Neogen.

INTRODUÇÃO

As micotoxinas estão espalhadas pelos cinco continentes. Na América do Norte, observa-se a presença das micotoxinas aflatoxinas, deoxynivalenol, zearalenona e ocratoxina. Na América Central e do Sul ocorrem aflatoxinas, deoxynivalenol, fumonisinas, ocratoxinas e a toxina T-2. Já na Europa e Ásia observa-se a presença de aflatoxinas, deoxynivalenol e zearalenona. Na África observam-se as aflatoxinas, as fumonisinas e a zearalenona; e na Oceania verificam-se as aflatoxinas e as fumonisinas (DEVEGOWDA,1999).

As aflatoxinas (AFs) são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, *A. flavus* e *A. parasiticus*, sendo as micotoxinas mais abundantes e mais tóxicas que se conhecem (ALDRED et al., 2004; SANTOS et al.,1998; PITT & HORKING, 1999). São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina,

porém, os principais tipos de interesse são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ (COULOMBE, 1991).

A toxicidade crônica destas micotoxinas pode levar a alterações hepáticas, redução do crescimento do animal e proteção imunológica. Na toxicidade aguda causa hemorragias subcutâneas e intramusculares resultando na morte do animal. Suínos e caninos são as espécies mais sensíveis, sendo normalmente animais jovens os mais afetados pela aflatoxicose (YU et al., 2005; ZLOTOWSKI et al., 2004; MALLMANN et al. 1994).

O conhecimento científico sobre as fumonisinas (FBs) é relativamente menor, quando comparada às aflatoxinas, embora sua ocorrência seja também bastante freqüente. Com distribuição mundial, os fungos do gênero *Fusarium*, produtores de fumonisinas, são importantes patógenos de cereais em todas as suas fases de desenvolvimento, incluindo o período após a colheita quando os grãos são armazenados (DIAZ; BOERMANS, 1994).

As dietas contaminadas por FBs provocam inapetência e depressão, induzindo toxicidade cardiovascular, edema pulmonar e degeneração hepática, e, em concentrações elevadas, podem provocar lesões pancreáticas, hepáticas e renais (LOVATTO et al., 2007).

Os principais ingredientes presentes na composição dos alimentos pet são milho, soja, e arroz. O fato das aflatoxinas e fumonisinas estarem presentes como contaminante natural em produtos de origem vegetal, faz com que haja um grande interesse no desenvolvimento de técnicas rápidas e sensíveis para detecção de micotoxinas em alimentos pet.

Os métodos disponíveis para detecção das micotoxinas em sua maioria são precisos, porém necessitam de um preparo longo as amostras e com grande complexidade.

Entre os vários métodos de análises, a cromatografia ocupa um lugar de destaque. A quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é também conhecida por HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromathography*. Este é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Os componentes que compõem um CLAE são reservatório da fase móvel, bomba de alta pressão, válvula de injeção, coluna, detector e registrador (GILBERT e ANKLAM, 2002; YANG et al., 2005).

Nos últimos anos vem aumentando a aceitação pelas técnicas de imunocromatografia de fluxo lateral para detecção quantitativa, que apresenta resultados de forma rápida para micotoxinas. Atualmente está disponível no mercado um grande numero de kits rápidos para detecção de diversas micotoxinas como: aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A, deoxynivalenol, toxina T2 e fumonisinas (PESTRKA et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do Kit Reveal® Q+ Aflatoxin para detecção de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂ e Kit Reveal® Q+ Fumonisin, para detecção de fumonisinas FB₁ e FB₂ em alimentos pet. Foram também analisadas 4 amostras com concentrações estimadas entre 5 e 20 ppb, contaminadas com aflatoxinas. Essas avaliações também foram realizadas com o método de cromatografia líquida de alta eficiência como forma de comparativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 26 amostras de alimento pet para detecção de aflatoxinas e fumonisinas. E também 4 amostras pré contaminadas com aflatoxinas.

Na preparação da amostra foram utilizados 4 kg de alimento pet para a análise de aflatoxinas e fumonisinas por CLAE e para a análise por Kit Reveal® Q+ para cada amostra. Foi efetuado o quarteamento, em quarteador 16 canais das amostras até adquirir a quantidade de duas amostras de 500 g cada, sendo em seguida moída a uma granulometria de 20 mesh.

O método utilizando cromatografia líquida foi realizado no laboratório SAMITEC – SOLUÇÕES ANÁLITICAS MICROBIOLÓGICAS E TECNOLÓGICAS LTDA, localizado na cidade de Santa Maria – RS.

O método utilizando imunocromatografia de fluxo lateral foi realizado através do Kit Reveal® Q+ aflatoxin e Kit Reveal® Q+ fumonisin, estas metodologias foram desenvolvidas pela Neogen Corporation (NASDAQ: NEOG).

As determinações das micotoxinas aflatoxinas e fumonisinas foram realizadas conforme metodologia descrita pela Neogen do Brasil, sendo o limite de detecção (LOD) para AFs ≥ 2 ppb e FBs ≥ 300 ppb.

Análises de aflatoxinas

Foram utilizados 10 g de cada amostra extraídos com 50 ml de álcool etílico 65%. A amostra foi agitada neste meio por 3 minutos vigorosamente e, em seguida, filtrada. Foram adicionados 500 µl do diluente ao tubo de diluição e coletado 100 µl do filtrado, adicionando – o ao tubo de diluição, misturando 5 vezes com auxílio de uma pipeta. Transferiu-se 100 µl do tudo de diluição para novo tubo e colocou a tira do teste Reveal® Q+ Aflatoxin, aguardando 6 minutos para leitura dos resultados no leitor Accuscan® Pro.

Análises de fumonisinas

Foram utilizados 10 g de cada amostra extraídos com 50 ml de álcool etílico 65%. A amostra foi agitada neste meio por 3 minutos vigorosamente e, em seguida, filtrada. Foram adicionados 200 µl do diluente ao tubo de diluição e coletado 100 µl do filtrado, adicionando – o ao tubo de diluição, misturando 5 vezes com auxílio de uma pipeta. Transferiu-se 100 µl do tudo de diluição para novo tubo e colocou a tira do teste Reveal® Q+ Fumonisin, aguardando 6 minutos para leitura dos resultados no leitor Accuscan® Pro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelos dois métodos são mostrados nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5. Onde é possível fazer a comparação dos resultados entre as duas metodologias.

As amostras com concentração com valores estimados entre 5 e 20 ppb para aflatoxinas, obteve-se resultados de 100% das amostras com resultados positivos nos dois métodos, podendo verificar uma precisão satisfatória na utilização dos métodos utilizados. Os valores obtidos nas duas metodologias são demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Comparação dos resultados das amostras com presença positiva para aflatoxinas, entre os métodos Kit Reveal® Q+ e HPLC.

Método	Kit Reveal® Q+	HPLC
Amostra	Aflatoxinas (ppb)	Aflatoxinas (ppb)
1	20	20,4
2	13,8	15,1
3	5,7	5,8
4	10	8,5

LOD = Limite Detecção – Kit Reveal® Q+: ≥ 2 ppb – HPLC: $\geq 0,1$ ppb.

Comparando os resultados de aflatoxinas nas amostras de alimento pet, analisadas pelo Kit Reveal® Q+ Aflatoxin, houve resultado positivo em 11,53% das 26 amostras, enquanto que o método HPLC apresentou resultado positivo em 3,84% das amostras de alimento pet (tabela 2).

Tabela 2 - Comparação dos resultados de aflatoxinas entre os métodos Kit Reveal® Q+ e HPLC.

Método	Kit Reveal® Q+	HPLC
Amostra	Aflatoxinas (ppb)	Aflatoxinas (ppb)
1	<LOD	<LOD
2	<LOD	<LOD
3	<LOD	<LOD
4	<LOD	<LOD
5	<LOD	<LOD
6	<LOD	<LOD
7	<LOD	<LOD
8	2,3	<LOD
9	<LOD	<LOD
10	<LOD	<LOD
11	<LOD	<LOD
12	<LOD	<LOD
13	<LOD	<LOD
14	<LOD	<LOD
15	<LOD	<LOD
16	<LOD	<LOD
17	<LOD	<LOD
18	2,2	<LOD
19	<LOD	<LOD
20	<LOD	<LOD
21	<LOD	<LOD
22	<LOD	1,4
23	2,2	<LOD
24	<LOD	<LOD
25	<LOD	<LOD
26	<LOD	<LOD

LOD = Limite Detecção – Kit Reveal® Q+: ≥ 2 ppb – HPLC: $\geq 0,1$ ppb.

A Tabela 3 demonstra os resultados nas amostras de alimento pet para detecção de fumonisinas, que foram obtidos pelo método do Kit Reveal® Q+ fumonisin, que apresentou resultados positivo em 84,61% das 26 amostras analisadas, assim como a técnica de HPLC que apresentou resultados positivos em 84,61% das 26 amostras.

Tabela 3 - Comparação dos resultados de fumonisinas entre os métodos Kit Reveal® Q+ e HPLC.

Método	Kit Reveal® Q+	HPLC
Amostra	Fumonisin (ppb)	Fumonisin (ppb)
1	400	500
2	400	400
3	300	150
4	700	700
5	500	499,8
6	600	547
7	300	373
8	400	373
9	500	661
10	300	429
11	300	523
12	850	747
13	300	382
14	900	910
15	<LOD	<LOD
16	600	585
17	400	436
18	500	545
19	500	800
20	400	546
21	<LOD	<LOD
22	500	421
23	<LQ	<LQ
24	500	696
25	500	580
26	<LOD	<LOD

LOD = Limite Detecção – Kit Reveal® Q+: ≥ 300 ppb – HPLC: ≥ 125 ppb

Ao interpolar as médias dos resultados conforme mostram as tabela 4 e 5 verifica-se a uma boa correlação dos resultados entre os métodos Kit Reveal® Q+ e HPLC, principalmente para análise para detecção de fumonisinas.

Tabela 4 – Análise estatística dos métodos Kit Reveal® Q+ e HPLC para análise de aflatoxinas utilizando Teste t.

	Kit Reveal Q+	HPLC
Média	0,2576	0,0538
Variância	0,5297	0,0753
Amostras	26	26
gl	50	
Teste t	1,3361	
P(T<=t) bi-caudal	0,1909	
t crítico bi-caudal	2,7384	

Tabela 5 – Análise estatística dos métodos HPLC e Kit Reveal® Q+ para análise de fumonisinas utilizando Teste t.

	Kit Reveal Q+	HPLC
Média	409,61	454
Variância	55203,84	63319,76
Amostras	26	26
gl	50	
Teste t	0,6573	
P(T<=t) bi-caudal	0,5139	
t crítico bi-caudal	2,6777	

Os dados dispostos na tabela 4 e 5 comprovam que não foram constatadas diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) no comparativos dos métodos HPLC e Kit Reveal® Q+, tanto para aflatoxinas como para fumonisinas, com um total de 26 análises com o método de quantificação.

O Kit Reveal® Q+ desenvolvido pela Neogen atende a necessidade da indústria, pois é um teste rápido e simples que permite verificar a qualidade de alimento pet quanto á presença de aflatoxinas e fumonisinas. A detecção de micotoxinas por HPLC também demonstrou eficiência nos resultados, contudo requer maior conhecimento do analista e dispende mais tempo de análise.

CONCLUSÃO

As metodologias utilizadas demonstraram resultado satisfatório. Quanto à detecção de aflatoxinas o método por HPLC apresenta maior sensibilidade para apresentar positividade com limite de quantificação para aflatoxinas igual a 1 µg/Kg

em comparação com a metodologia desenvolvida pela Neogen. Na comparação com os testes de fumonisinas por HPLC e Kit Reveal® Q+, demonstrou proximidades na sensibilidade entre os métodos. Os órgãos fiscalizadores da indústria pet food determinam limites máximo por contaminação por micotoxinas, sendo aflatoxinas < 20 ppb e fumonisinas < 5000 ppb. Com os resultados apresentados se faz necessário o controle dos alimentos produzidos para cães e gatos para garantir a qualidade dos produtos. O método desenvolvido pela Neogen demonstra desempenho satisfatório para o acompanhamento do alimento pet, por se demonstrar eficiente e de rápida resposta.

REFERÊNCIAS

- ABINPET – **Manual Pet Food Brasil 9ª Edição**. Disponível em: < <http://abinpet.org.br/manual-pet-food-brasil/> >. Acesso em 08 Set. 2018, 10H02min.
- ALDRED, D.; MAGAN, N.; OLSEN, M. **The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals**. Woodhead Publishing, 2004.
- CANÇADO, R. A.1; FREITAS, R. J. S. de. Metodologia simplificada para detecção de aflatoxinas em milho. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n. 2, p. 95-102, Jul.-Dez./2002.
- COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: Sharma, R. P. & Salunkhe, D. K., Eds. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton, CRC Press, 1991. P.103-43.
- CRUZ, Juliana Victorino da Silva. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho utilizando como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 2010. 88 f. Dissertação (Doutorado) - USP, Pirassununga, 2010.
- DEVEGOWDA, G. Micotoxinas: assassinos escondidos nas rações animais. **Feeding Times**, New York, v.1, n.1, p. 13-17, 1999.
- DIAZ, G.J.; BOERMANS, H.J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Vet. Human Toxicol.**, v.36, p. 548-55, 1994.
- GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining Mycotoxins in foodstuffs. **TrAC**, Amsterdam, v. 21, p. 468-486, 2002.
- HORN, M. B. **Micotoxinas em silagens de milho do sul de Brasil e metodologia para aflatoxinas por espectroscopia de infravermelho próximo em milho**. Florianópolis, 2013. Dissertação (Pós Graduação em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.

INSTITUTO SAMITEC – **Micotoxinas**. Disponível em: < <https://www.samitec.com.br/site/> >. Acesso em 07 Set. 2018, 20H:00min.

LOVATTO P.A.; LEHNEN C.R.; CAVAZINI N.; BERTOLIN K.; HAUSCHILD L. Relação entre fumonisinas na dieta de leitões na creche e a ocorrência do vício de sucção, desempenho e características de alguns órgãos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 004, 2007.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO JM, WENTZ I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria. p.635-43. 1994.

NEOGEN - **Bem-vindo à Neogen Corporation**. Disponível em: < <http://www.neogen.com/pt/> >. Acesso em 07 Set. 2018, 9H:02min.

NEOGEN - **Reveal® Q+ para Aflatoxina**. Disponível em: < <http://foodsafety.neogen.com/pt/reveal-q-plus-aflatoxin> >. Acesso em 08 Set. 2018, 09H:00min.

NONES, J.; **Avaliação da contaminação por micotoxinas em ingredientes e rações para suínos**. Florianópolis, 2010. Relatório (Estagio Supervisionado II ao Departamento de Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N & SUYKINO, Immunological assays form mycotoxin detection, **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 120-128, 1995.

PITT, J.; HOCKING, A. **Fungi and food spoilage**: An Aspen publication, 2nd ed p. 387-383, 1999.

SABINO, M.; MILANEZ, T. V.; LAMARCO, L. C. A.; NAVAS, S. A.; STOFER, M. & GARCIA, C. B. Avaliação da eficiência de dois kits comerciais para detecção de aflatoxinas B₁ em amostras de milho, ração e amendoim e seus produtos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.17, n. 2, p. 107-110, 1997.

SANTOS, I.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. **Fungos contaminantes na indústria alimentar**. **Micoteca da Universidade do Minho**, Centro de Engenharia Biológica, p. 98, 1998.

SISTEMA de Amostragem: Importância do sistema Amostral. Disponível em: < <https://www.lamic.ufsm.br/site/quem-somos/sistema-de-amostragem> >. Acesso em 20 ago. 2018, 10H05min.