

**MÉTODOS IMUNOLÓGICOS NA DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO
DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS:
VANTAGENS E INCONVENIENTES**

Maria Amélia Amado *

* Professora Coordenadora da ESAV

RESUMO:

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por espécies do género *Aspergillus*. Merecem especial atenção por parte da indústria dos alimentos, porque são substâncias altamente tóxicas e carcinogénicas para o homem e animais. Este facto levou, nos últimos anos, a uma intensa investigação no sentido de as detectar e prevenir, utilizando diversos métodos analíticos. Entre eles encontram-se os métodos imunológicos, que irão ser tratados neste artigo, destacando-se as suas principais vantagens e inconvenientes.

INTRODUÇÃO

Cada vez mais na comunicação social ouvimos falar em **segurança alimentar** e **toxicologia** e no perigo que certos produtos alimentares representam para a saúde humana e animal. Entre os tóxicos contaminantes dos alimentos encontram-se as aflatoxinas, metabolitos altamente tóxicos e carcinogénicos, produzidos por bolores do género *Aspergillus*, que merecem especial atenção no sentido de as detectar e prevenir os seus efeitos.

Os métodos imunológicos têm sido largamente utilizados na pesquisa das aflatoxinas, devido à sua sensibilidade, especificidade, rapidez, simplicidade e baixo custo. Utilizam anticorpos específicos para isolar e/ou detectar micotoxinas nos alimentos. A base destes métodos é a interacção entre antígenos (micotoxinas) e anticorpos específicos, (Figura 1) produzidos num organismo animal, geralmente o coelho, pelos linfócitos B (Bergere, 1991).

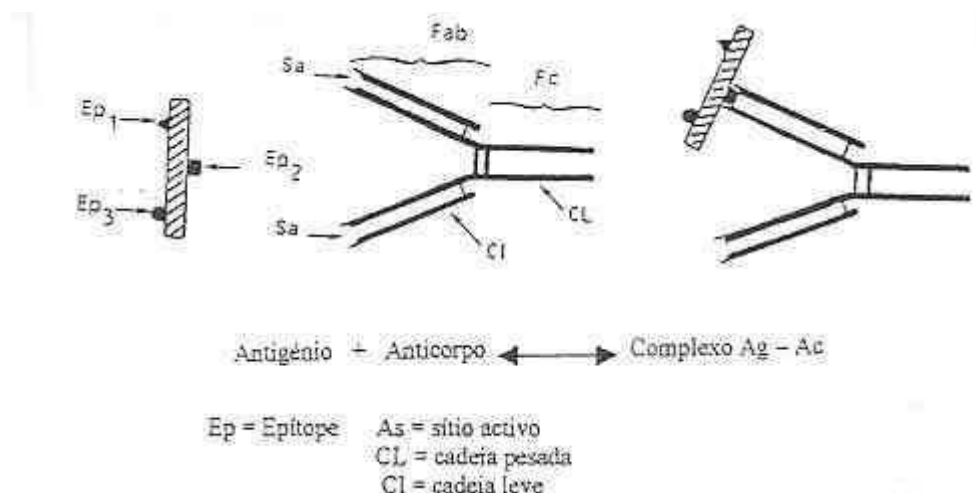


Figura 1 - Reacção antígeno - anticorpo (Bergere, 1991)

Os anticorpos, ou imunoglobulinas, encontram-se particularmente no sangue. Eles são glicoproteínas com uma estrutura em Y constituída por quatro cadeias polipeptídicas (Figura 1). Cada ramo da parte em V transporta um sítio activo complementar de um epítotope, podendo assim cada molécula de anticorpo ligar-se a duas moléculas de antígeno transportando um epítotope idêntico. A cauda do Y, não participa directamente na ligação com o antígeno mas permite a fixação a certas células, à proteína A dos estafilococos e activa o complemento. Cada linhagem de linfócito produz apenas um tipo de anticorpos reconhecendo somente um único epítotope (Bergere, 1991).

Ainda que o antígeno que serviu para inocular o animal seja bastante puro, o imunoso ro obtido é sempre constituído por uma mistura de anticorpos dirigidos contra os diferentes epítotope. Eles são tanto mais numerosos quanto mais complexo for o antígeno; por estas razões são chamados anticorpos policlonais. São uma mistura complexa de anticorpos distintos, produzidos por clones individuais de linfócitos B.

Kohler e Milstein, em 1975, realizaram trabalhos através dos quais conseguiram obter um clone celular produzindo um só anticorpo com especificidade bem definida, chamado por isso anticorpo monoclonal (Figura 2). Estes anticorpos são de pureza bastante elevada e mais sensíveis às condições de ligação do que os anticorpos policlonais. Aqueles anticorpos podem apresentar reacções cruzadas com outras moléculas, pelo que a sua especificidade deve ser comprovada.

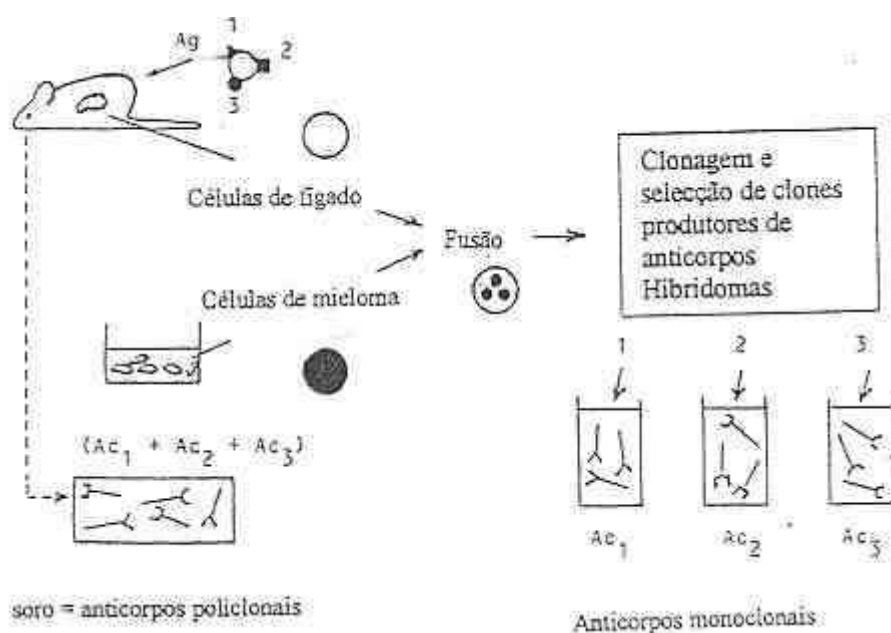


Figura 2 - Produção de anticorpos monoclonais e policlonais (Kohler e Milstein, 1975)

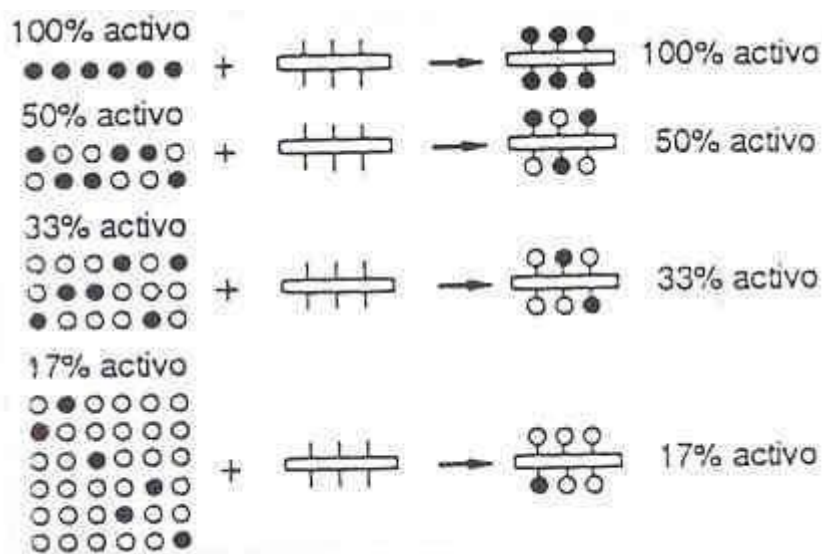
Entre os métodos imunológicos utilizados na dosagem de aflatoxinas os mais comuns são o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) aprovado como método oficial da AOAC (Assotiation of Official Analitical Chemist's) para triagem de aflatoxinas (Scott, 1990), RIA (radio-imuno-assay) e IAC (immunoaffinity chromatography). As duas técnicas RIA e ELISA, são baseadas na competição de ligação entre a toxina não marcada proveniente da amostra e a toxina marcada sobre os locais específicos do anticorpo; a imunoafinidade é uma técnica cromatografica baseada directamente na ligação antigénio (toxina) com o anticorpo fixado numa coluna (Fremy e Chu, 1989).

A primeira técnica imunológica a ser introduzida foi o radioimunoensaio em finais dos anos 50. A partir daqui, os imunoensaios tornaram-se importantes instrumentos de análise na química clínica, sendo utilizados na análise de alimentos, mais concretamente na pesquisa de micotoxinas, a partir dos anos 80 (Fremy e Chu, 1989). Este atraso deveu-se ao facto das micotoxinas serem haptenos, o que significa que não são imunogéneas, tendo que conjugar-se com uma proteína antes de ocorrer a imunização, para se obter o antisoro. Estas conjugações podem complicar-se, porque a maioria das micotoxinas não têm um grupo reactivo adequado na molécula para se poderem unir à proteína suporte. Este facto levou ao desenvolvimento rápido de métodos para preparação de conjugados de micotoxinas e em particular de conjugados de aflatoxinas. Actualmente pode dispôr-se de antisoros contra algumas micotoxinas e

micotoxinas marcadas com indicador, tendo a maioria destes antisoros sido já utilizados na determinação de aflatoxinas (Bergere, 1991).

1 - RADIO-IMUNOENSAIOS (RIA)

Foram inicialmente introduzidos por Benson e Yelow (1959) para medir a concentração de insulina no soro. Revelaram-se como os métodos mais sensíveis e versáteis na quantificação de antigénios ou haptenos marcados com isótopos radioactivos. O marcador mais usado é um análogo tritiado do analito, a maior parte das vezes o tritium H. Como o tritium é um isótopo de baixa energia , a única forma de determinar a sua actividade, em boas condições, é através de contadores de cintilação líquida. (RIVM/ARO, 1993). São técnicas muito sensíveis, até 0.01 ng/ml. O método RIA (Figura 3) necessita da incubação simultânea de uma solução de amostra ou tóxina padrão conhecida, com um teor constante de toxina marcada e anticorpos específicos. A toxina livre e a toxina ligada ao anticorpo são em seguida separadas antes de avaliar a quantidade de marcador numa ou noutra fase. A separação faz-se normalmente por absorção da fase tritiada livre a carvão revestido com dextrano, seguindo-se uma centrifugação para libertar a fase ligada da livre, ficando aquela no sobrenadante, ao qual, depois da decantação, é misturado o líquido de cintilação, seguindo-se a medida da radioactividade por espectrometria de cintilação líquida (O' Keeffe e Hopkins, 1998; Gaspar e Maghuin - Rogister, 1985; Niemi et al., 1990; Hendriks et al., 1993, in Castilho, 1996).



Porção de ensaio que contem antigénio	anticorpo	complexo antigénio- anticorpo
--	-----------	----------------------------------

- antigénio marcado

o antigénio não marcado

Figura 3 - Mecanismo do Radio – imunoensaio

Esta radioactividade é uma medida da quantidade de antigénio sem marcar (a aflatoxina que se procura) presente na solução de ensaio. Regra geral, a avaliação da quantidade de micotoxina numa amostra desconhecida, é determinada a partir de uma curva padrão estabelecida em função da radioactividade da fracção ligada e da fracção livre em relação ao logaritmo da concentração da toxina padrão não marcada.

São poucos os casos de aplicação dos métodos RIA realizados e publicados na investigação de micotoxinas. Para além da dosagem de aflatoxinas conhecem-se dosagens de toxina T-2 e zearalenona. A pouca utilização deste método deve-se provavelmente a algumas desvantagens que passamos a referir:

- requer laboratórios apropriados;
- baixa selectividade;
- poucos anticorpos comercialmente disponíveis;
- limitada duração da actividade dos radioisotopos;
- problemas da eliminação dos resíduos;
 - certo grau de reactividade cruzada com interferentes existentes na amostra que podem originar falsos-positivos;
- custo do espectrometro de cintilação líquida.

Os inferiores limites de detecção que se conseguem com o ELISA em detrimento do RIA, e a complexidade do equipamento indispensável para a aplicação do método RIA, para além do inconveniente que envolve o trabalho com material radioactivo, levou à utilização do ELISA e IMUNOAFINIDADE, até porque existem kits de aplicação que permitem a sua utilização rápida por uma pessoa não especializada em técnicas imunológicas (Amado, 1999).

2 - ENSAIO IMUNOENZIMOLOGICO (EIA)

O avanço mais importante nos imunoensaios foi o desenvolvimento dos imunoensaios enzimáticos. As primeiras técnicas EIA foram descritas independentemente em 1971. A partir daí, foram usadas para detectar uma enorme variedade de diferentes antigénios e anticorpos. Os princípios e procedimentos da técnica EIA são basicamente semelhantes aos das técnicas RIA exepituando que utilizam enzimas em vez de isótopos radioactivos. Os imunoensaios não isotópicos apresentam várias vantagens em relação ao radioimunológicos como sejam:

- maior estabilidade dos reagentes;
- maior especificidade , devido ao uso de antigénios marcados com enzima;

- produzirem, de modo geral, ensaios homogéneos;
- ausência do perigo de radiações.

Podem considerar-se duas etapas nas técnicas EIA: a reacção primária entre os imunoreagentes (anticorpos e antigénio correspondente) e a detecção usando enzimas como indicadores, previamente ligadas aos reagentes (Puchades et al., 1992). As técnicas EIA dividem-se em dois grandes grupos: "enzyme-multiplied immunoassay techniques" (EMIT) e "enzyme-linked immunosorbent assays" (ELISA). Nas técnicas EMIT a reacção ocorre num meio líquido homogéneo e a separação entre reagentes ligados e não ligados não é satisfeita. Nas técnicas ELISA, parte das reacções ocorrem em meio sólido que também serve para separar os imunocomplexos dos reagentes não ligados (Morris et al., 1986).

Vamos centrar a nossa exposição nos métodos ELISA (Figura 4), uma vez que são os mais utilizados na pesquisa e determinação de aflatoxinas em alimentos. Eles podem assumir uma forma competitiva ou não competitiva. Num ELISA competitivo tipo, o analito aparece em concentrações variáveis na mistura da reacção em contacto com o anticorpo específico, e compete com uma quantidade constante de analito previamente imobilizado na fase sólida. A concentração do anticorpo deve ser limitada a fim de assegurar a eficácia da competição. No ensaio não competitivo, o anticorpo reage proporcionalmente com a quantidade de analito da amostra. Em ambos os métodos, a quantidade de anticorpo que no final se mostra ligado à fase sólida, é directa ou inversamente proporcional à quantidade de analito na amostra original. Para detectarmos este anticorpo ligado pode utilizar-se uma técnica directa ou uma técnica indirecta (Puchades et al., 1992).

Na técnica directa, o anticorpo específico com um título constante, é fixado sobre a placa ou tubo de microtitulação. Em seguida, a solução de amostra e uma quantidade conhecida constante de conjugado "toxina-enzima" são incubados simultaneamente. Depois de lavagem, a toxina - enzima ligada à placa por intermédio do anticorpo, é "revelada" por junção dum substracto cromogéneo específico de enzima. A cor obtida é medida por fotometria ou apreciada visualmente.

Na técnica indirecta, a toxina é fixada sobre a placa por intermédio de um conjugado toxina-poli-peptídeo. Em seguida, a solução de amostra e uma quantidade constante de anticorpo são incubados simultaneamente. Depois da lavagem, a quantidade de anticorpo ligado à placa é determinada por

junção de um conjugado enzimático. A cor obtida depois da junção do substrato cromogénico específico da enzima é medida do mesmo modo que na técnica directa.

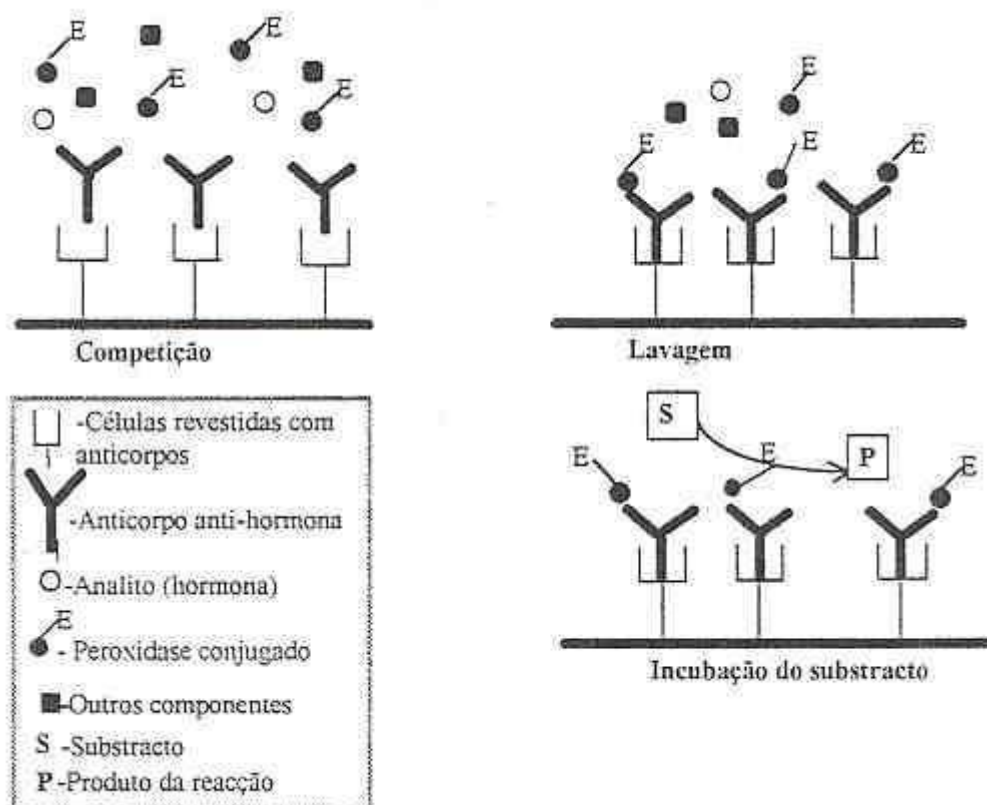


Figura 4 - Representação esquemática de um método imunoenzimático (ELISA)

As enzimas marcadoras mais utilizadas são a catalase, a glucose-oxidase, a -galactosidase, a fosfatase alcalina e a peroxidase.

Segundo Scott (1990), este método tem sido posto em causa devido a possíveis interferências de outros componentes da amostra e variabilidade devida às condições do teste. Outro problema possível é a especificidade e selectividade do ELISA (Amado, 1999). De facto, muitas micotoxinas têm estruturas químicas estreitamente afins e por isso, existe a possibilidade de poderem ocorrer reacções cruzadas entre os anticorpos produzidos para uma determinada aflatoxina, contra outras toxinas que podem aparecer ao mesmo tempo, dentro do mesmo grupo (Lino et al.,1998). Em alguns dos equipamentos comerciais para aflatoxinas, pode acontecer que o anticorpo mostre uma certa reactividade cruzada com outras aflatoxinas. Daqui que o resultado considerado positivo possa não dar informação selectiva

no que se refere à concentração das aflatoxinas separadas. Van Peteghem (1992) refere que o ELISA pode conduzir a resultados falso-positivos, devido quer à sua sensibilidade para com os compostos interferentes da matriz quer, por vezes, à "deficiente" especificidade dos anticorpos.

No entanto, devido a vantagens como:

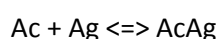
- a sua sensibilidade;
- a enorme quantidade de amostras que se podem manipular num dia, o que se traduz em baixos custos por análise;
- a necessidade de pequenas quantidades de anticorpo diluído, podendo usar-se a mesma quantidade para um grande número de amostras,

os métodos ELISA, apesar dos inconvenientes atrás referidos, são hoje ainda largamente utilizados.

3 - CROMATOGRAFIA DE IMUNOAFINIDADE (IAC)

A cromatografia de imunoafinidade, em que as colunas contêm anticorpos selectivos imobilizados para aflatoxinas, tornou-se um método muito válido pois "com as colunas de imunoafinidade o procedimento para o pré-tratamento da amostra total é reduzido a uma única extracção em fase sólida" (Mortimer et al., 1997). A purificação e separação da amostra utilizando colunas de imunoafinidade, é particularmente eficaz para a detecção de aflatoxinas, passando a amostra directamente através da coluna e depois de várias lavagens, a aflatoxina é eluída num extracto muito limpo e adequado para ser analisado por HPLC. Segundo Gilbert (1993), os resultados são claros e não há interferência de picos nos cromatogramas.

A cromatografia de imunoafinidade fundamenta-se na interacção fraca que envolve apenas ligações covalentes, principalmente de Van der Waals e electrostáticas, entre um anticorpo e um antigénio:



Depois de serem produzidos, os anticorpos são purificados pelo processo clássico de precipitação com sulfato de amónio, que por sua vez é removido por diálise, por cromatografia de troca iónica ou de permeação de gel.

Os anticorpos usados podem ser monoclonais ou policlonais e são considerados como reagentes ou como grupos funcionais ligados a um suporte sólido com características próprias e singulares, não causando problemas diferentes dos de outros grupos funcionais químicos. Os anticorpos monoclonais resultam, como já foi referido, de um único clone de linfócitos. São de pureza elevada e mais sensíveis às condições de ligação do que os anticorpos policlonais. Aqueles anticorpos podem apresentar reacções cruzadas com outras moléculas, pelo que a sua especificidade deverá ser comprovada (Castilho, 1996).

A característica mais importante exigida para os anticorpos a utilizar nas colunas de imunoafinidade, é a sua especificidade, afinidade, estabilidade face às condições de lavagem, e reversibilidade. É também essencial que o complexo aflatoxina-anticorpo possa ser dissociado para libertar a aflatoxina. O suporte inerte sólido onde os anticorpos são imobilizados na coluna por uma ligação covalente, é constituído por agarose gel, trisacril, poliacrilamida ou celulose, previamente activados por uma reacção com brometo de cianogénio ou com carbonildiimidazol, formando-se o imunoadsorvente. Na activação do suporte são introduzidas ligações do tipo isoureia, pelo brometo de cianogénio, ou do tipo uretano, quando o reagente é o carbonildiimidazol. Este é considerado melhor reagente de activação do suporte uma vez que a ligação uretano, ao contrário da ligação isoureia, não se encontra ionizada e é de grande estabilidade. O imunoadsorvente é então transferido para uma coluna, à qual é aplicada a amostra ou o extracto aquoso a analisar. Por um processo de interacção imunoquímico, as moléculas do analito (hapteno) vão ser fixadas aos anticorpos imobilizados, enquanto os componentes interferentes não ligados ao suporte, que possam encontrar-se na coluna, são eliminados por lavagem da coluna com uma solução salina de tampão fosfato (Katz, 1992).

A quantidade de analito que é retido por um processo de imunoafinidade é sempre inferior à quantidade máxima calculada. A especificidade do anticorpo para o analito faz diminuir os interferentes eluídos da coluna, sendo o eluato isolado praticamente puro. As colunas podem ser reutilizadas regenerando-as por vários processos entre os quais podemos referir a lavagem com tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, contendo 0,02% de azida de sódio (Van Ginkel et al., 1993, in Castilho, 1996). Na figura 5 apresenta-se o princípio de purificação das colunas de imunoafinidade.

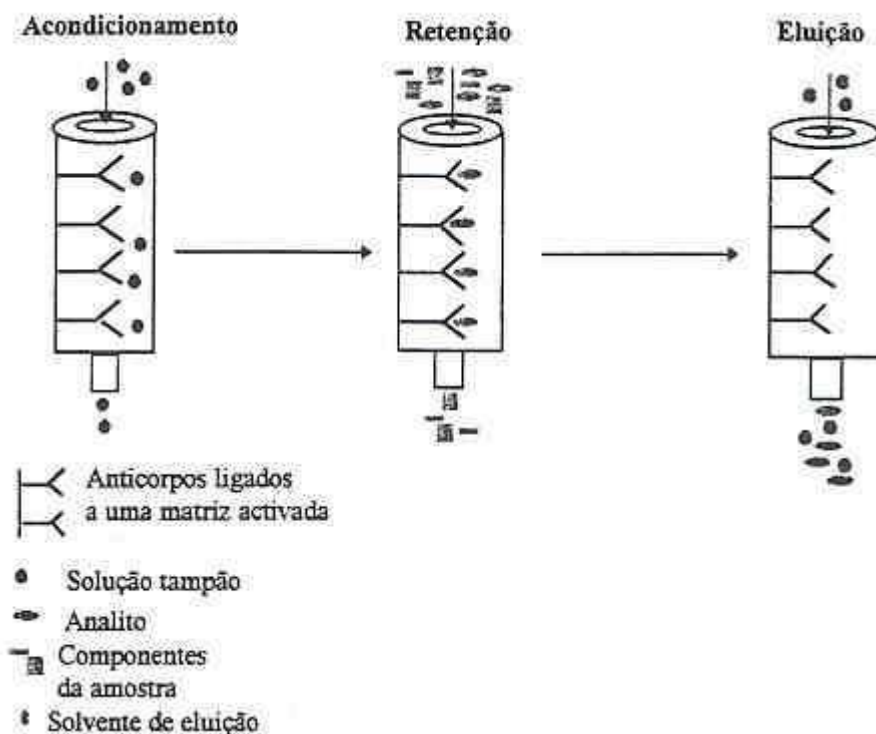


Figura 5 - Princípio de purificação das colunas de imunoafinidade (in Castilho 1996)

Embora o IAC, seja uma técnica quer de extracção quer de purificação da amostra considerada por vários investigadores superior a muitas outras (Amado, 1999; Lino et al., 1998), é necessário não esquecer a fragilidade das colunas e o perigo de contaminação de uma extracção/purificação para outra (no caso das colunas serem reutilizadas) e, por outro lado, o número de moléculas que podem ser controladas, dado este sistema ser restrito, devido à falta de anticorpos disponíveis no comércio. Uma outra desvantagem é o custo elevado dos kits (Castilho, 1996).

4 -CONCLUSÃO

Face aos resultados obtidos em diversos trabalhos de investigação, entre as quais destacamos os de Scott, 1990; Van Peteghem, 1992; Castilho, 1996; Whitaker et al., 1996; Lino et al., 1998 e Amado, 1999, que vêm ao encontro das vantagens e dos inconvenientes dos métodos imunológicos que abordámos neste artigo, julgamos poder concluir que a metodologia mais adequada na detecção e determinação de aflatoxinas nos alimentos, utilizando estes métodos, será a combinação do ELISA com o HPLC (cromatografia líquida de alta pressão), destinando-se as colunas de imunoafinidade à purificação das amostras. O ELISA utilizar-se-à para uma separação rápida e o IAC/HPLC para a análise quantitativa das amostras positivas. Será este no nosso entender um procedimento útil e eficiente. No entanto, não será demais recordar que o IAC não é uma técnica quantitativa mas sim uma técnica altamente sensível e selectiva que oferece a possibilidade de extrair/purificar com rigor as amostras ou os seus extractos, antes da sua quantificação pelos métodos físico-químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADO, M. A. - Avaliação da Micoflora Natural e ocorrência de Aflatoxinas B1, B2, G1, e G2 em Amendoim e Amêndoa de Caju. Viseu: Instituto Politécnico: 1999. Dissertação apresentada em Concurso de Provas Públicas para acesso à categoria de Professor Coordenador.
- BERGERE, J. L. - Techniques d'analyse immunochimiques, in Tecnicas d'analyse et contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires. Linden G. Goord. Paris: Apria. 2 (1991) 343-370.
- CASTILHO, M. C. - Resíduos de Hormonas Anabilizantes: Estudos de Metodologias analíticas multiresíduos. Coimbra: Faculdade de Farmácia:1996. Tese de Doutoramento.
- FREMY, J. M. ; CHU, F. S. - Immunochemicals methods of analysis for Aflatoxins, in Micotoxins in Dairy Products. Van Emond ed. New York: Elsevier. (1989) 97-125.
- GILBERT, J. - Recent advances in analytical methods for mycotoxins. Food Additives and Contaminants. 10 (1993) 37-48.
- KATZ, S. E. ; SIEWERSKI, M. - Drug residue analysis using immunoaffinity chromatography. Journal of Chromatography. 642 (1992) 403-409.
- LINO, C. M. et al - Research on medicinal plants. II. Contamination With aflatoxins B1, B2, G1 and G2. Livro de actas do 1º Encontro Internacional de Plantas aromáticas e medicinais. Ansião, (1998) 112-117.
- MORTIMER, D. N. et al. - Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxins M1, in liquid and powdered milk using affinity column cleanup. Journal of Chromagrapthy. 407 (1997) 393-398.
- PUCHADES, R. et al. - A Comprehensive Overview on the Application of Low Injection Techniques in Immunoanalysis. Critical Review in Analytical Chemistry. 23:4 (1992) 300-321.
- VAN PETEGHEM, C. - Review of methods for residue analysis. In Vitro toxilogical studies and real time analysis of residues in food FLAIR. Concerted. Action nº8. Proceeding of Workshops held in Ghent, May 22-24, 1992, and Thessaloniki, October 30-31, 1992. 41-46.

Amado, Maria Amélia (2002). Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes. *Millenium*, 26.

-WHITAKER, T. et al. - Prediting the distribution of aflatoxin test results from farmer's stock peanuts. Journal AOAC Int. 77:3 (1996) 659-666.