

Utilização de kits de imunoensaio para detecção de insetos e fragmentos de insetos em grãos e alimentos

Márcia Bittar ATUI

Instituto Adolfo Lutz - Divisão de Bromatologia e Química - Seção de Microscopia Alimentar

A presença de insetos e seus fragmentos, pêlos de roedores, bárbulas de penas de aves e outras sujidades em grãos e produtos alimentares são indicativos das condições sanitárias nas quais os produtos são armazenados e/ou processados. A detecção desses contaminantes representa um desafio constante para os cerealistas e para a indústria.

Os fragmentos de insetos encontrados nos alimentos são provenientes do exoesqueleto de insetos vivos ou mortos, particularmente partes do corpo e apêndices de larvas ou adultos presentes dentro dos grãos, pois as infestações externas são geralmente removidas durante o processo de limpeza do produto na indústria. Os testes para verificar a infestação por insetos em produtos armazenados têm que ter a capacidade de detectar quantidades mínimas de material pertencente aos insetos em grandes quantidades de outros materiais moídos. A alta seletividade dos ensaios imunológicos os torna bem adaptados a este objetivo⁴.

A miosina é uniformemente distribuída nas diferentes espécies de insetos e presente em grandes quantidades tanto nos músculos dos adultos como nos dos insetos imaturos e é o melhor indicador da presença de larvas dentro do grão, pois é menos variável que a contagem de fragmentos de insetos^{3,6}.

Desta forma, foram desenvolvidos ensaios bioquímicos, baseados no teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para acessar e quantificar a presença da miosina presente nos músculos dos insetos^{1,5,6}. Esta técnica combina precisão e exatidão com repetibilidade, além de exigir um treinamento mínimo, e ser aplicável a uma grande variedade de produtos armazenados a baixo custo.

O método de ELISA usa anticorpo policlonal que reage extensivamente entre as várias espécies de insetos que infestam grãos, de modo que o total da infestação dos grãos e subprodutos pode ser determinado quantitativamente. Este método é um bom instrumento para análise de grãos e subprodutos infestados².

O ensaio baseado em uma reação colorimétrica, fornece resposta consistente para a avaliação de uma grande quantidade de insetos. É altamente específico, requer pouco tempo para treinamento e custa menos que a análise para contagem de fragmentos de insetos⁶.

Para o desenvolvimento de um imunoensaio para uma proteína específica de um inseto de produto armazenado é

necessário um Anticorpo (Ac) diretamente contra a proteína ou Antígeno (Ag), que deve estar presente em grandes quantidades na maior parte da vida do inseto e nos fragmentos. Necessariamente, o Ac não deve dar reações cruzadas com nenhum material do grão. O melhor seria usar como Ag uma proteína que fosse vagarosamente reativa, assim, o Ac diretamente, contra a proteína de inseto específica de uma espécie, poderia reagir com a mesma proteína numa larga variedade de espécies de insetos. A miosina foi escolhida pois, está de acordo com estes critérios. Para o desenvolvimento do ensaio, a miosina de grilo, *Achaeta domesticata* (Orthoptera: Gryllidae) foi utilizada, pois existem em grande quantidade na natureza e pode ser extraída facilmente, de seus músculos femurais. Segundo Quinn *et al.*⁶, o Ac diretamente contra a miosina do ortóptero daria uma resposta uniforme a uma grande variedade de pragas de produtos armazenados.

Para a elaboração do imunoensaio, as paredes dos poços das placas de plástico são imunizadas (revestidas internamente) com Ac policlonais. Quando uma alíquota do extrato de grão ou farinha é adicionada aos poços, qualquer material do inseto presente é seletivamente ligado ao Ac preso à parede dos poços. Após a lavagem para remover os materiais estranhos da planta, um segundo Ac que é conjugado com uma enzima é adicionado e se liga seletivamente à miosina presente. Após nova lavagem, um substrato específico para a enzima é adicionado para que ocorra a produção de cor. A cor desenvolvida e sua intensidade são proporcionais à quantidade de miosina presente na alíquota avaliada, correlacionando bem com a massa muscular do inseto presente na amostra de trigo ou farinha. Existe correlação entre a quantidade de miosina e o número de insetos e fragmentos de insetos presentes na amostra.

Os imunoensaios oferecem vantagens em relação às metodologias convencionais para detectar a infestação por insetos em produtos alimentícios, pois podem ser usados em alimentos *in natura* ou processados, permitem analisar um grande número de amostras de uma só vez no laboratório ou poucas amostras em silos ou armazéns. O teste de ELISA detecta todas as pragas de produtos armazenados nos diversos grãos (trigo, milho, aveia, cevada, soja, sorgo e arroz) e em vários produtos alimentícios (amendoim, amêndoas, frutas secas e especiarias). Assim, este teste representa uma ferramenta versátil e precisa para a detecção destes insetos em grãos e seus subprodutos.

As técnicas de imunoensaio utilizando reagentes marcados para a detecção de Ag e Ac são extremamente sensíveis e econômicas no uso de reagentes. Os ensaios com anticorpos de fase sólida, com ligantes marcados com isótopos radioativos ou enzimas são, provavelmente, os métodos imunológicos mais amplamente utilizados, pela possibilidade de se realizar vários testes simultaneamente em um período de tempo relativamente curto. Neste imunoensaio tipo sanduíche podem ser testadas ao mesmo tempo mais de 24 amostras em duplicata em aproximadamente 2 horas e meia.

O teste requer equipamentos modestos, sendo que o de custo maior é a leitora de absorbância que varia de US\$ 2.000,00 a US\$ 6.000,00. O pessoal técnico pode ser treinado com eficiência em poucos dias⁵.

Enquanto outros métodos para pesquisa de insetos e fragmentos de insetos vêm sendo usados há muitos anos, poucos trabalhos foram publicados utilizando o método de ELISA, portanto mais pesquisas se fazem necessárias para o aprimoramento desta técnica.

REFERÊNCIAS

1. Bair, J.; Kitto, G.B. New methods for rapid determination of insects in grain. *Proceedings of GEAPS Exchange' 92, 63rd International Technical Conference & Exposition of GEAPS*, pp: 85-94, 1992.
2. Chen, W.M.; Kitto, G.B. Species-specific immunoassay for *Sitophilus granarius* in wheat. *Food & Agricultural Immunology*, 5: 165-175, 1993.
3. Flinn, P.W. ; Hagstrum, D.W. Augmentative releases of parasitoid wasps in stored wheat reduces insect fragments in flour. *Journal of Stored Product Research*, 37: 179-186, 2001.
4. Kitto, G.B.; Quinn, F.A.; Burkholder, W.E. Development of immunoassays for quantitative detection of insects in stored products. *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection*. Volume I, 415-420, 1992.
5. Kitto, G.B.; et al. Immunoassays for detecting insect contamination of foods products. In: *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety*. R.C. Beier and L.H. Stanker (eds.) Washington, DC, Americal Chemical Society, 1996.
6. Quinn, F.A.; Burkholder, W.; Kitto, B. Immunological technique for measuring insect contamination of grain. *Journal of Economic Entomology*, 85: 1463-1470, 1992.