

Parceer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Maria Angélica Marochi e aprovada pela comissão julgadora em 25.11.88.  
Campinas, 25 de novembro de 1988.

Lucia Valente Soares

Presidente da Banca

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UMA METODOLOGIA PARA TRIAGEM, QUANTIFICAÇÃO E  
CONFIRMAÇÃO DE TRICOTECENOS E ZEARALENONA  
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

MARIA ANGÉLICA MAROCHI

Farmacêutica-Bioquímica

16/88

Prof.ª Drs LUCIA MARIA VALENTE SOARES

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências

## INDICE

	Página
Lista de convenções .....	v
Índice de tabelas .....	vii
Índice de figuras .....	ix
Resumo .....	x
Summary .....	xi
1. Introdução .....	01
2. Revisão bibliográfica .....	03
2.1. Tricotecenos .....	03
2.1.1. Estrutura química e estabilidade .....	03
2.1.2. Microorganismos produtores e condições de produ- ção .....	07
2.1.3. Toxicidade .....	09
2.1.4. Incidência .....	15
2.2. Zearalenona .....	21
2.2.1. Estrutura química e estabilidade .....	21
2.2.2. Microorganismos produtores e condições de produ- ção .....	23
2.2.3. Toxicidade .....	24
2.2.4. Incidência .....	25
2.3. Metodologia analítica .....	27
2.3.1. Extração e limpeza .....	27
2.3.2. Quantificação .....	33
2.3.3. Confirmação .....	40

	Página
2.3.4. Outros métodos .....	43
3. Materiais e métodos .....	45
3.1. Padrões de micotoxinas .....	45
3.2. Avaliação de reveladores .....	45
3.3. Teste de sistemas solventes para desenvolvimento si- multâneo de diacetoxiscirpenol, toxina T2, roridina A, verrucarina A e zearalenona em camada delgada .....	47
3.4. Preparo de amostras artificialmente contaminadas .....	48
3.5. Verificação da aplicabilidade do método Soares-Amaya para tricotecenos .....	49
3.6. Desenvolvimento de novos métodos .....	49
3.6.1. Milho .....	49
3.6.1.1. Procedimento para extração e limpeza .	50
3.6.1.1.1. Clarificantes .....	50
3.6.1.1.2. Minicolunas para limpeza .....	52
3.6.1.2. Avaliação da eficiência da limpeza do extrato .....	54
3.6.1.3. Método desenvolvido para milho .....	54
3.6.1.4. Quantificação .....	55
3.6.2. Feijão, arroz e soja .....	56
3.6.2.1. Procedimento para extração e limpeza .	56
3.6.2.2. Avaliação da eficiência da limpeza do extrato .....	58
3.6.2.3. Método desenvolvido para feijão, soja e arroz .....	58

	Página
3.6.3. Trigo .....	58
3.6.3.1. Procedimento para extração e limpeza .	58
3.6.3.2. Avaliação da eficiência da limpeza do extrato .....	60
3.6.3.3. Método desenvolvido para trigo .....	60
3.7. Verificação da recuperação do sistema analítico desen- volvido .....	61
3.8. Determinação do limite de detecção do método .....	61
3.9. Verificação da repetibilidade do sistema analítico de- senvolvido, com amostras contaminadas por inoculação de cepas toxigênicas de <u>Fusarium</u> .....	61
3.10. Teste de adequação do tempo de extração .....	62
3.11. Desenvolvimento do sistema de confirmação .....	63
3.12. Sistema de confirmação proposto para tricotecenos ...	63
3.13. Descrição da verificação do sistema de confirmação ..	64
4. Resultados e discussão .....	66
4.1. Escolha de reveladores .....	66
4.2. Sistemas solventes .....	69
4.3. Avaliação do método Soares-Amaya .....	75
4.4. Metodologia analítica desenvolvida .....	77
4.4.1. Milho .....	77
4.4.2. Feijão, arroz e soja .....	81
4.4.3. Trigo .....	81
4.4.4. Recuperação dos métodos desenvolvidos .....	83
4.4.5. Limite de detecção dos métodos .....	86
4.4.6. Repetibilidade .....	87

	Página
4.4.7. Adequação do tempo de extração .....	88
4.5. Confirmação .....	88
4.6. Verificação do sistema de confirmação .....	92
5. Conclusões .....	95
6. Referências bibliográficas .....	97
7. Agradecimentos .....	120

## LISTA DE CONVENCÕES

B.M.	.....	Banho-maria
CCD	.....	Cromatografia em camada delgada
CG	.....	Cromatografia gasosa
CLAE	.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
CRO	.....	Protocin
C.V.	.....	Coefficiente de variação
DAS	.....	Diacetoxiscirpenol
DCE	.....	Detector de captura eletrônica
DIC	.....	Detector de ionização de chama
DON	.....	Deoxinivalenol
ELISA	.....	Enzyme ImmunoSorbent Assay
E.M.	.....	Espectrometria de massa
FUS X	.....	Fusarenona X
HT2	.....	Toxina HT2
ip	.....	Intraperitoneal
iv	.....	Intravenosa
L. detecção	.....	Limite de detecção
NEO	.....	Neosolanol
NIV	.....	Nivalenol
NBP	.....	4 (p-nitrobenzil) piridina
RIA	.....	RadioImuno Assay
ROR A	.....	Roridina A
T2	.....	Toxina T2

T.A. .... Temperatura ambiente  
UV ..... Ultravioleta  
VER A ..... Verrucarina A  
ZEA ..... Zearalenona

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Classificação dos principais tricotecenos .....	05
2. Tricotecenos produzidos por diferentes espécies de <u>Fusarium</u> .....	08
3. Comparação dos efeitos tóxicos de vários tricotecenos ....	12
4. Menores níveis que induzem citotoxicidade em células epiteliais humanas HEp-2 .....	13
5. Papel dos tricotecenos em micotoxicoses .....	16
6. Toxinas de <u>Fusarium</u> sp em rações nos EUA .....	18
7. Incidência de tricotecenos .....	19
8. Tipos de extração e limpeza para zearalenona e tricotece- nos .....	28
9. Limites de detecção encontrados em CCD .....	36
10. Limites de detecção conseguidos em CG .....	37
11. Enfoques utilizados para confirmação de zearalenona .....	41
12. Enfoques utilizados para confirmação de tricotecenos ....	41
13. Reações químicas para ZEA e tricotecenos .....	42
14. Adsorventes e solventes de eluição utilizados na limpeza do extrato de milho .....	53
15. Sistemas de limpeza testados para feijão, arroz e soja ..	57
16. Minicolunas testadas para o trigo .....	59
17. Limites de detecção sob luz ultra violeta de ondas longas	66
18. Limites de detecção sob luz visível .....	67
19. Cores visualizadas sob luz ultravioleta de ondas longas .	68



	Página
20. Cores visualizadas sob luz visível .....	69
21. Sistemas solventes e Rf encontrados para as micotoxinas .	70
22. Avaliação de clarificantes .....	79
23. Clarificantes testados para o trigo .....	82
24. Valores da recuperação dos métodos desenvolvidos .....	85
25. Limite de detecção dos métodos .....	86
26. Valores encontrados em 5 determinações de uma mesma amostra contaminada por inoculação com <i>F. sporotrichioides</i> ....	87
27. Valores encontrados no tempo de adequação de extração ...	88
28. Resultados observados das reações químicas avaliadas ....	90
29. Toxinas produzidas por diferentes cepas de <i>Fusarium</i> .....	93

## INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estrutura básica dos tricotecenos .....	04
2. Estrutura da zearalenona .....	22
3. Comportamento de alguns tricotecenos diante da variação na proporção de tolueno em acetato de etila, na mistura tolueno/acetato de etila (v/v) contendo 0,5% de ácido fórmico .....	71
4. Comportamento de alguns tricotecenos diante da variação na porcentagem de metanol na mistura metanol/clorofórmio (v/v) .....	72
5. Comportamento de alguns tricotecenos diante da variação na proporção de n-hexano em acetona (v/v) .....	73
6. Comportamento de alguns tricotecenos diante da variação na proporção de tolueno na mistura acetato de etila:acetona (2:1) (v/v) .....	74
7. Metodologia desenvolvida para milho .....	80
8. Metodologia desenvolvida para trigo .....	84
9. Espectros de T2 em espectrometria de massa .....	94

## RESUMO

Surtos de fusariose em animais são regularmente relatados no sul do país, importante centro produtor de grãos. Paralelamente o Brasil importa cereais de países em que, reconhecidamente, existem problemas com tricotecenos e zearalenona. Com a falta de procedimentos analíticos simples e de baixo custo, levantamentos da incidência destas micotoxinas e sua fiscalização não têm sido possível em nosso país até a presente data.

Para suprir esta lacuna, foi desenvolvido um procedimento analítico para determinação de toxina T2, diacetoxiscirpenol, roridina A, verrucarina A e zearalenona em milho, feijão, soja e arroz. Um outro procedimento, variante do primeiro, foi desenvolvido para determinação de toxina T2, diacetoxiscirpenol, roridina A, verrucarina A em trigo. Os coeficientes de variação obtidos, de 12% e 16%, respectivamente com amostra contaminada por inoculação de cepas toxigênicas de Fusarium e com amostras artificialmente contaminadas, e a recuperação média de 101%, demonstram a repetibilidade e a exatidão da metodologia proposta. Os limites de detecção conseguidos mostraram a sua adequação para trabalhos com amostra contendo teores médios e altos de contaminação (zearalenona - 154  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; diacetoxiscirpenol - 900 a 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; toxina T2 - 650 a 1100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; roridina A - 790  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; verrucarina A - 900 a 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Um sistema para confirmação de tricotecenos, em camada delgada, é proposto visando permitir uma maior segurança nos resultados dos laboratórios sem acesso a espectrometria de massa. Cinco reveladores, três sistemas solventes em conjunto com uma reação de acetilação, rea-

lizada diretamente em placa, são empregados.

## SUMMARY

Outbreaks of fusariotoxicoses in animals have been regularly reported in the Southern Brasil, important grain production center. On the other hand, Brasil imports cereals from countries known to have problems with trichothecenes and zearalenone in their products. Lacking simple and low cost analytical methods, surveys of the incidence of these mycotoxins, as well as their control, have not been possible to date in this country.

In answer to this need, an analytical method was developed to determine T2 toxin, diacetoxyscirpenol, roridin A, verrucarín A and zearalenone in maize, beans, soybeans and rice. A variation of the above procedure was tested in wheat to determine T2 toxin, diacetoxyscirpenol, roridin A and verrucarín A. Coefficients of variation of 12% and 16%, were obtained in samples contaminated with toxigenic strains of Fusarium and samples artificially contaminated. Detection limits were: zearalenone: 154  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; diacetoxyscirpenol: 900- 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; T2 toxin: 650-1100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; roridin A: 790  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and verrucarín A: 900-1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , showing the adequacy of the method for medium and highly contaminated samples.

A system for confirmation of trichothecenes in TLC also has been developed and proposed in order to assure more reliable results in laboratories with no access to mass spectrometry. Three solvent systems, five color developing sprays in conjunction with an acetylation reaction performed directly on the TLC plate, are employed.

## 1. INTRODUÇÃO

Os tricotecenos compreendem cerca de 65 micotoxinas produzidas especialmente por espécies de Fusarium. Apresentam um espectro de efeitos danosos em animais, que incluem redução na produção dos componentes sanguíneos, necrose da pele, inflamação e necrose do aparelho digestivo e destruição da medula óssea. A zearalenona, que possui efeitos estrogênicos em animais, também é produzida por este tipo de fungo. Todas são produtos secundários do metabolismo destes fungos quando submetidos a condições de baixas temperaturas e elevada umidade. Tais condições climáticas são encontradas no sul do nosso país, bem como em outros países dos quais o Brasil importa cereais.

Dados sobre a incidência de tricotecenos na alimentação humana e mesmo animal no Brasil são inexistentes. No entanto, surtos de fusariotoxicose vêm sendo regularmente relatados em animais nos estados do cone sul. Tal vazio de informações deve-se à metodologia analítica atualmente disponível que é dispendiosa e de execução complexa, utilizando principalmente o binômio cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Como consequência, tal tipo de trabalho tem estado fora do alcance da maioria dos laboratórios, inclusive dos de pesquisa e daqueles pertencentes a órgãos oficiais de fiscalização.

O preenchimento de semelhante lacuna de informações só se dará com o desenvolvimento de uma metodologia analítica que atenda às reais condições dos laboratórios nacionais. Isto significa procedimentos de simples execução, baixo custo e que utilizem equipamentos facilmente disponíveis. Atingidas estas condições, a geração de dados

deverá ocorrer espontaneamente, forçada pela necessidade, em várias partes do país e em vários setores envolvidos na produção, comercialização e fiscalização de alimentos.

Foram estabelecidos como princípios norteadores deste trabalho o emprego de solventes de baixo custo e toxidez para extração, de clarificantes para limpeza devido a sua simplicidade e rapidez e de cromatografia em camada delgada para detecção, quantificação e confirmação por sua disponibilidade, baixo custo e simplicidade. Estes critérios vêm de encontro ao objetivo principal que é o desenvolvimento de um método simples e de baixo custo para determinação de tricoteceenos. Paralelo a este, tivemos também o objetivo de desenvolver um método multitoxina, isto é, que num só procedimento seja capaz de determinar várias micotoxinas, fato este extremamente desejável pela economia de tempo e reagentes envolvidos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TRICOTECENOS

#### 2.1.1. ESTRUTURA QUÍMICA E ESTABILIDADE

Os tricotecenos constituem uma família de sesquiterpenóides com funções éster e álcool residindo na periferia da molécula. Possuem uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupo epóxido nos carbonos 12 e 13 e por isso, são usualmente descritos como 12,13 epóxi-tricotecenos (117)

A estrutura química básica apresentada por todos os membros desta família está na figura 1.

Tricodermol, o membro mais simples do grupo, possui uma função hidroxila na posição 4. Os demais membros apresentam substituições do hidrogênio, em algumas ou em todas as posições 3, 4, 7, 8 e 15, por grupos hidroxila ou por grupos ésteres. Frequentemente, o grupo éster é um acetato, embora ésteres dos ácidos butenóico e isovalérico também sejam encontrados. Em alguns casos o carbono 8 é substituído por uma cetona (C=O). Uma série de diésteres macrocíclicos são também conhecidos (31).

Os tricotecenos são classificados em 4 grupos, de acordo com suas características químicas (31,117,151) (tabela 1)



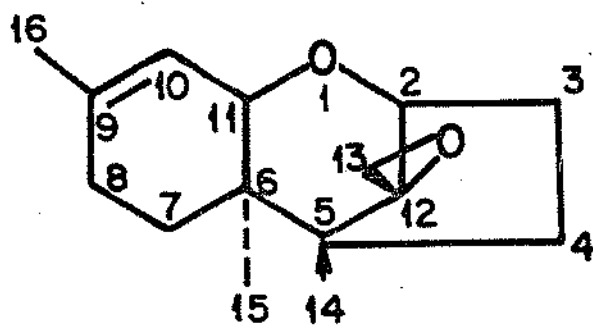
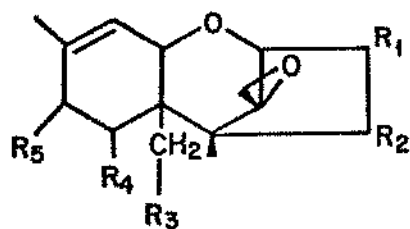


FIGURA 1: Estrutura básica dos tricotecenos

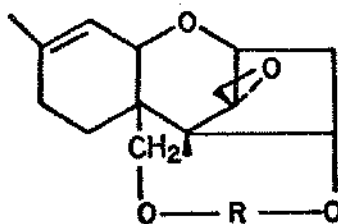
TABELA 1: Classificação dos principais tricotecenos (151)

Grupo	Abreviatura	Tricoteceno	R1	R2	R3	R4	R5	
A	---	Tricodermol	H	OH	H	H	H	
	---	Tricodermin	H	OAc	H	H	H	
	---	Verrucarol	H	OH	OH	H	H	
	---	Scirpentriol	OH	OH	OH	H	H	
	T2 tetraol	Toxina T2 tetraol	OH	OH	OH	H	OH	
	MAS	Monoacetoxiscirpenol	OH	OH	OAc	H	H	
	DAS	Diacetoxiscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H	
	NEO	Neosolanol	OH	OAc	OAc	H	OH	
	HT2	Toxina HT2	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
	T2	Toxina T2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
	Acetil T2	Toxina acetil T2	OAc	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
B	---	Tricotecin	H	OCOCH=CHCH <sub>3</sub>	H	H	=O	
	DDN	Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH	=O	
	NIV	Nivalenol	OH	OH	OH	OH	=O	
	FUS X	Monoacetilnivalenol (Fusarenona X)	OH	OAc	OH	OH	=O	
	---	Monoacetildeoxinivalenol	OAc	H	OH	OH	=O	
C	VER A	Verrucarina A	$R = \begin{array}{c} \text{O} & & \text{O} & & \text{O} \\ \parallel & & \parallel & & \parallel \\ -\text{CCHOHCHMeCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CHCH}=\text{CHC}- \end{array}$					
	ROR A	Roridina A	$R = \begin{array}{c} \text{O} & & \text{O} & & \text{O} \\ \parallel & & \parallel & & \parallel \\ -\text{CCHOHCHMeCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CHCH}=\text{CHC}- \\ \text{MeCHOH} \end{array}$					
D	---	Crotocol	R2= OH					
	CRO	Crotocin	R2= OCOCH=CHCH <sub>3</sub>					

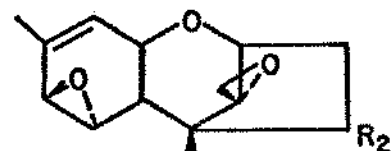
OAc= acetato, Me= metil



GRUPOS A e B



GRUPO C



GRUPO D

Os tricotecenos do grupo A possuem uma função hidroxila ou éster nos carbonos 3, 4, 8 e 15. Os do grupo B contêm uma carbonila no carbono 8, além das funções equivalentes ao grupo A nos carbonos 3, 4, 7 e 15. Os tricotecenos macrocíclicos compreendem o grupo C e apresentam um sistema de anel entre os carbonos 4 e 15. Os do grupo D possuem uma segunda função epóxido na posição dos carbonos 7 e 8.

Os tricotecenos são incolores, cristalinos, sólidos ópticamente ativos, solúveis em álcool, acetona, acetato de etila e clorofórmio, mas pouco solúveis em água. São estáveis quando estocados a temperatura ambiente, e poucos deles são afetados pelos processos normais de cozimento (3). Podem ser armazenados à temperatura ambiente por anos, ou aquecidos a 100°C por uma hora sem perda de atividade (117). Sob condições alcalinas, os grupos presentes nos diversos tricotecenos são prontamente saponificados originando produtos menos acetilados ou álcoois derivados.

O anel epóxido, que inclui os carbonos 12 e 13 e ao qual se atribui a toxidez dos tricotecenos, somente pode ser aberto por hidrólise em condições fortemente ácidas ou por redutores potentes tais como hidreto de alumínio e lítio (150). Trata-se de uma estrutura que nos tricotecenos apresenta grande estabilidade térmica, o que é incomum em epóxidos. Tal comportamento indica uma proteção do grupo epóxido por outras partes da molécula, tornando seu acesso difícil para quaisquer reações químicas (98).

## 2.1.2. MICROORGANISMOS PRODUTORES E CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO

Tricotecenos são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de fungos, principalmente do gênero *Fusarium*, além de *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium* e *Cylindrocarpum* (54).

Os tricotecenos do grupo A são produzidos por várias espécies de *Fusarium*, assim como os do grupo B. Os do grupo C têm sido isolados de vários gêneros de fungo incluindo-se *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium* e *Cylindrocarpum*, e os do grupo D são metabólitos de fungos dos gêneros *Trichothecium*, *Cylindrocarpum* (31), *Trichoderma* e *Cephalosporium* (16). São também citadas espécies dos fungos *Trichoderma*, *Trichothecium* e *Myrothecium*, como produtores de tricotecenos dos grupos A e B (3,5,16).

Estes fungos estão amplamente distribuídos na natureza e têm sido isolados de uma série de produtos usados tanto para alimentos como para rações. Os níveis críticos de umidade para o desenvolvimento de espécies de *Fusarium* variam entre 22,2 e 30% em cereais (67).

Cerca de 65 tricotecenos já foram isolados e caracterizados. Até o presente, apenas as toxinas T2, DAS, HT2, NIV e DON foram encontradas ocorrendo naturalmente em alimentos (103).

Estudos "in vitro" denotam a tendência para produção simultânea de dois ou mais tricotecenos por fungo (tabela 2). A quantidade, no entanto, pode variar consideravelmente dependendo da temperatura, tempo de crescimento, cepa e substrato. Este é o caso do *Fusarium tricinctum* cepa T2, que apresenta maior produção de DAS e T2 a 8°C. A 24°C, o mesmo fungo, produz HT2 além de DAS e T2 e estes dois últimos

a níveis bem inferiores que a 8°C (5).

Realmente, a produção máxima de tricotecenos parece estar associada a baixas temperaturas para a maioria dos fungos. Em contraste, a temperatura ótima de crescimento está sempre próxima à temperatura ambiente (4,5,85). Como um exemplo adicional temos Myrothecium verrucaria que cresce melhor a 27°C mas que produz quantidades elevadas de verrucarinas e roridinas a 8°C (4).

Com relação à variação do substrato, Fernando *et al.* (34) encontraram uma considerável produção de ROR A (350 mg/kg) e VER A (210 mg/kg) por cepas de Myrothecium roridum e M. verrucaria em aveia e trigo respectivamente. Já quando utilizaram cevada, estas quantidades foram cerca de 2 a 4 vezes menores.

TABELA 2: Tricotecenos produzidos por diferentes espécies de Fusarium

Espécies	Tricotecenos produzidos
<u>F.nivale</u>	FUS X, NIV
<u>F.poa</u>	NEO, T2, HT2, DAS
<u>F.sporotrichioides</u>	NEO, T2, HT2, DAS
<u>F.roseum</u>	NEO, T2, HT2, DON
<u>F.equiseti</u>	NEO, T2, DAS
<u>F.graminearum</u>	NEO, T2, HT2, DAS
<u>F.oxysporum</u>	FUS X, T2, HT2, DAS
<u>F.solani</u>	NEO, T2, HT2, DAS

### 2.1.3. TOXIDEZ

Os tricotecenos são, dentre as micotoxinas conhecidas, os que afetam o maior número de funções em animais, a saber: sistema nervoso, aparelho digestivo, regiões produtoras de componentes sanguíneos e pele.

A patologia aguda dos tricotecenos apresenta uma estreita correlação com a causada por danos radioativos (agentes radiomiméticos) (98) e a causada por agentes alquilantes. É caracterizada por emese, inflamação, hemorragia, recusa alimentar, diarreia, aborto, mudanças hematológicas, angina necrótica, desordens nervosas e destruição da medula óssea (149). Estes sinais clínicos dependem de uma série de variáveis, incluindo toxinas presentes, seus níveis, tempo de ingestão, assim como da espécie e do estado nutricional dos animais envolvidos (143). Em geral, a toxidez aguda em animais jovens ou imaturos é maior que em adultos. Não foram observadas diferenças com relação ao sexo (149).

Intoxicações em homens e animais atribuídas ao consumo de produtos contaminados com *Fusarium* sp têm sido relatadas, desde 1913, particularmente no Japão, Coréia, Rússia e EUA. Dentre estes incidentes, o mais conhecido foi o surto de aleucia tóxica alimentar (ATA) que ocorreu na região de Orenburg, na Rússia, na época da II Guerra Mundial, e onde foram registradas fatalidades excedendo 10% da população (20). A epidemia foi correlacionada com alimentos preparados com trigo que permaneceu nos campos, sem colher, durante o inverno. Neste trigo foi constatada a infestação por *F. sporotrichioides* e *F. poae* (57)

Yagen et al. analisando metabólitos produzidos por F. poae e F. sporotrichioides envolvidos neste surto, constataram que 95% deles produziam T2. Administraram extratos de tais espécies toxigênicas a gatos. Paralelamente, administraram T2 a um grupo controle. Ambos os grupos apresentaram os mesmos sintomas característicos da doença, ou seja, vômitos, leucopenia, hemorragias e distúrbios neurológicos, levando à conclusão que esta foi a micotoxina causadora da ATA (161).

Os sintomas clínicos da ATA são descritos em seres humanos seguindo estágios sucessivos. Num primeiro estágio, sensação de queima na boca, esôfago e estômago, seguida de vômito, diarreia e dores abdominais. Num segundo estágio, há um acentuado decréscimo no número de leucócitos acompanhado de agranulopenia e linfocitose. Num terceiro estágio, desenvolvem-se hemorragias petequiais em várias partes do corpo (pescoço, braços, coxas e face) e aparecem áreas necrosadas na garganta. Finalmente, num quarto estágio, o paciente ou entra em convalescença ou morre. No caso de sobrevivência, levará 2 meses para a capacidade medular de produzir componentes sanguíneos voltar ao normal. A doença é também caracterizada por angina necrótica, exaustão da medula óssea, sangramento do nariz, garganta e gengiva (57). Estes sinais podem ser generalizados para as intoxicações agudas por tricotecenos tanto em animais como em humanos.

Muitos dos efeitos causados pelos tricotecenos decorrem de sua capacidade de inibir a síntese de proteínas e de DNA em células eucarióticas, resultando em uma ação altamente citotóxica (149). Esta citotoxicidade está relacionada com sua toxicidade letal, toxicidade dérmica, danos celulares às células em divisão e depressão da resposta imunológica (148). A interrupção da síntese dá-se nos ribossomas, e

dependendo do tricoteceno, ocorre no início, na fase intermediária ou no término da síntese da proteína. O estágio no qual a síntese é interrompida parece estar relacionado com o tamanho da molécula, os tricotecenos de maior peso molecular (macrocíclicos) agem no início, e os de menor peso molecular, no estágio final (55).

Thompson e Wannemacher analisaram 19 tricotecenos em sua capacidade relativa de inibir a síntese protéica. Os mais potentes (T2, VER A e ROR A) têm grupo acetil lateral ou uma cadeia hidrogênio-carbono entre os carbonos 4 e 15 da estrutura básica. A perda dos grupos laterais resulta em redução da inibição de síntese protéica (T2 para HT2, NEO ou DAS). Quando os efeitos "in vitro" foram comparados com os resultados dos testes de letalidade no animal, muitos dos tricotecenos que se mostraram fracos inibidores de síntese protéica "in vitro" exibiram toxidez "in vivo" similar à toxina T2. Logo, a resposta celular "in vitro" de um dado tricoteceno nem sempre é um prognóstico apurado da toxidez no animal (141)

Vários trabalhos têm demonstrado que os tricotecenos macrocíclicos são os mais tóxicos, seguidos pelos representantes dos grupos A, B e D (tabela 3).

Os resultados da administração por via intraperitoneal indicaram que a toxidez aguda dos compostos macrocíclicos é maior que a apresentada pelos grupos A e B, e demonstraram também que para a maioria dos tricotecenos a toxidez oral é levemente maior do que a intraperitoneal (117).

O teste de citotoxicidade para VER A, VER B e ROR A em células de tumor de ratos apresentou como resultado a inibição de 50% do crescimento celular numa concentração de cerca de 1 ng/mL, o que colo-



ca estes compostos entre os agentes citostáticos mais ativos conhecidos (45,127).

**TABELA 3:** Comparação dos efeitos tóxicos de vários tricotecenos (149)

Micotoxina	DL 50* (mg/kg)	I.F. ( $\mu$ g)	I.S.P ( $\mu$ g/mL)	poder emético (mg/kg)	
				em patos	em gatos
T2	5,2	0,2	0,03	0,1	0,1
HT2	9,0	0,2	0,03	0,1	---
DAS	23	0,2	0,03	0,2	---
NEO	14,5	1,0	0,25	0,1	---
NIV	4,1	10,0	3,0	1,0	---
FUS X	3,3	1,0	0,25	0,4	1,0
DON	70,0	---	---	13,5	---
VER A	1,5 (iv)	0,05	0,01	---	---
ROR A	1,0 (iv)	0,05	0,01	---	---
CRO	700 (iv)	10,0	0,45	---	---

\*= DL50 em camundongos, ip (mg/kg)

I.F.= Inflamação cutânea em porcos da Índia ( $\mu$ g)

I.S.P.= Inibição da síntese protéica em reticulócitos de coelho DI50 ( $\mu$ g/mL)

Ao comparar-se a toxidez dos tricotecenos com outras micotoxinas, percebe-se que os tricotecenos estão entre os agentes mais po-

tentes, como cita Niku-Paavola *et al.* que encontraram valores de DL50 de 3,0; 4,0 e 5,5 mg/kg respectivamente para T2 em camundongo, T2 em rato e aflatoxina em rato (83).

Esta constatação é reforçada numa comparação realizada entre 32 micotoxinas, que apontou ROR A e VER A como as mais potentes dentre as investigadas (96) (tabela 4)

**TABELA 4:** Menores níveis que induzem citotoxicidade em células epite-  
liais humanas HEp-2

Micotoxinas	Quantidade (ng)
ROR A	0,0001
VER A	0,1
Aflatoxina B1	100
Esterigmatocistina	100
T2	10
HT2	10
DON	100
ZEA	100
DAS	1
Ocratoxina A	não tóxica mesmo a 1000 ng
Rubratoxina A	não tóxica mesmo a 1000 ng
Aflatoxina G1	não tóxica mesmo a 1000 ng

Efeitos subclínicos, tais como diminuição do ganho de peso e redução na defesa imunológica, têm sido observados em animais que consumiram rações contaminadas a níveis inferiores ao necessário para dar origem a um quadro agudo (90). Trenholm *et al.* citam diminuição de ganho de peso em porcos alimentados com ração contendo 300  $\mu$ g/kg de DON. (144). A ingestão subcrônica de tricotecenos foi relatada como a causa do decréscimo nas células brancas circulantes em gatos (149). Por sua vez, suínos alimentados com níveis subagudos de T2 (12 mg/kg), por 3 meses, desenvolveram extrema congestão no intestino e duto biliar, além de apresentarem sinais de infertilidade (155). Também notou-se que animais que consumiram tricotecenos (T2), tornaram-se vulneráveis a doenças infecciosas (91).

A toxidez subaguda é ainda demonstrada em pombos, nos quais T2 apresentou efeito emético quando aplicada por via intravenosa na asa ou por entubação, a um nível de 0,72 mg/kg. Já a dose de 2,75 mg/kg mostrou-se letal (29). Numa outra experiência, observou-se a formação de um grande abscesso no local das aplicações intramusculares realizadas em um novilho que recebeu 20 mg de T2/dia, seguindo-se morte após 60 dias (3).

Com relação a efeitos crônicos dos tricotecenos, não foi observado nenhum sintoma óbvio que os implicasse como carcinogênicos (117). Estudos de mutagenicidade também indicaram resultados negativos para os vários tricotecenos testados (120,156). Já a toxina T2 mostrou-se teratogênica em camundongos (49,125). Anomalias na cauda e nos membros foram produzidas por uma dose intraperitoneal de 0,5 mg/kg no 10º dia de gestação. Dez dias mais tarde, foram constatadas uma mortalidade fetal de 30% e uma incidência de 12% de malformações (49).

Paralelamente, experiências com galos novos indicaram que não há acúmulo de T2 e HT2 no fígado. Após ingestão de ração contendo 15 mg/kg de T2 e HT2, não mais se pôde encontrar T2 no fígado após 4 horas e meia e o HT2, após 8 horas (64).

#### 2.1.4. INCIDÊNCIA

Os tricotecenos têm sido encontrados em milho, cevada, trigo, aveia, centeio, sorgo, amendoim, semente de adlay (job's tears), silagem, feno, rações e até em produtos processados tipo "corn flakes".

Uma série de toxicoses ocorridas no período de 1930 a 1960, tais como vertigem dos cereais (Taumelgetreide), estaquibotriotoxicose, dendrodoquiotoxicose, toxicose do pedúnculo do feijão (Bean hull toxicosis) são atualmente atribuídas a tricotecenos. Na época em que estes relatos foram feitos, os recursos analíticos não permitiam uma identificação das toxinas implicadas. Os fungos encontrados nos alimentos ou rações associados às micotoxicoses foram isolados a partir de 1968 e foram capazes de produzir tricotecenos em culturas. Entretanto, a presença de tricotecenos nas amostras de campo, suspeitas de causarem toxicoses, não foi estabelecida. Todos estes casos de intoxicações têm um denominador comum, isto é, os sintomas descritos são similares aos induzidos em animais através de administração de tricotecenos puros ou culturas de fungos reconhecidamente produtores de tricotecenos, principalmente Fusarium sp (87) (tabela 5)

TABELA 5: Papel dos tricotecenos em micotoxicoses (87)

Toxicose	Local	Animais afetados	Fungos isolados	Micotoxinas*
Vertigem dos cereais	Sibéria	cavalos	<i>G.saubinetii</i>	tricotecenos
ATA	Rússia	homens	<i>E.seorotrichioides</i>	T2
Estaquibotriotoxicose	Europa	cavalos	<i>S.atra</i>	satratoxinas
Toxicose do pedúnculo do feijão	Japão	cavalos	<i>E.solani</i>	T2, NEO
Toxicose do fungo vermelho (Red-mold toxicose)	Japão	cavalos, suínos, vacas	<i>E.graminearum</i>	DON, NIV
Toxicose do milho mofado (Moldy corn toxicose)	EUA	suínos, vacas	<i>E.tricinatum</i> <i>E.roseum</i>	DON, T2, DAS
Dendrodoquiotoxicose	Europa	cavalos	<i>D.foxicum</i>	tricotecenos
Fusariotoxicose	Canadá	patos, gansos, cavalos, suínos	<i>Fusarium</i> spp	T2

\*= Micotoxinas produzidas pelos fungos isolados em cultura.

Nos EUA, Mirocha (76) reportou a presença de DAS, DON, T2 e ZEA em rações implicadas em micotoxicoses em suínos e bovinos (tabela 6). Eppley (32), em 1972, testou 173 amostras de milho pelo método biológico em pele de coelho e encontrou 93 (54%) com um "fator irritante de pele", presumivelmente T2, em concentrações de 0,05 a 1,0 mg/kg de milho. A presença de T2 entretanto não foi comprovada. Ciegler (20), analisando 10 destas amostras, encontrou DON e T2 em algumas delas. Na Universidade de Wisconsin, um grupo de pesquisadores demonstrou a presença de T2 em milho mofado, associado com doença e morte de vacas lactantes em um rebanho daquela região (52). Levantamentos mais atuais continuam demonstrando a presença de tricotecenos em cereais naquele país (tabela 7).

No Japão, várias ocorrências envolvendo tricotecenos têm sido relatadas. Durante a chamada toxicose do pedúnculo de feijão (bean hull toxicosis), onde cavalos foram envenenados, *F. solani* M.1.1 foi isolado das amostras e posteriormente produziu T2 e NEO em laboratório (152). Na chamada doença do fungo vermelho (akakabi ou red mold disease) NIV e DON foram encontrados em cevada e trigo ligados ao incidente (150).

A partir de 1982, levantamentos têm demonstrado a presença de DON e NIV em alimentos utilizados para homens e animais (tabela 7). Um destes foi realizado por Yoshizawa e Hosokawa (163) onde seis amostras de cevada torrada foram coletadas no comércio de Kagawa, Ehime e Kumamoto, e todas apresentaram-se positivas para DON e NIV, nas faixas de 25 a 85 e de 37 a 190  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente.

TABELA 6: Toxinas de *Eusarcium* sp em rações, nos EUA (76)

Amostra	Micotoxinas encontradas	concentração (µg/kg)	Diagnóstico	Alimento/localidade
A	DAS	500	Síndrome de hemorragia intestinal em suínos	rações/ Univ. Minnesota
B	DAS	380	Síndrome de hemorragia intestinal em suínos	rações/ Univ. Minnesota
C	DON ZEA	1500 250	Recusa alimentar em suínos	milho/ Michigan
D	DON ZEA	1000 175	Recusa alimentar em suínos	milho/ Indiana
E	DON ZEA	100 1750	Recusa alimentar em suínos	milho/ Ohio
F	DON ZEA	40-60 3600	Recusa alimentar e evacuação sanguínea em suínos	rações
G	T2 ZEA	76 700	Evacuação sanguínea em bovinos	rações/ Nebraska
H	DON ZEA	1000 ---	Vômitos em cães	rações/ Iowa
I	DON ZEA	1000 traços	Recusa alimentar em suínos	rações/ Minnesota

TABELA 7: Incidência de tricotecenos

Micotoxinas	Produto	Amostras / Amostras positivas/ analisadas	% de amostras positivas	Teor médio (µg/kg)	País	Ano	Referência
Tricotecenos (DAS, T2, DON)	cereais, rações silagens, feno	25/800	3,1	-----	África do Sul	1982 1983	27
DON T2	trigo	31/33 0/33	94 0	1,782 -----	EUA	1982	44
DON	trigo	145/161	90	1000 a 4000	EUA	1982	115
NIV DON	cereais	17/31 20/31	55 65	101 31	Inglaterra	1984	135
DON NIV	trigo	18/18 7/18	100 39	3812 205	Japão	1984	137
DON NIV DON VIV DON NIV DON NIV DON NIV	far. trigo far. cevada cevada polida adlay milho de pipoca	26/36 12/36 3/6 6/6 10/14 13/14 2/12 11/12 7/7 0/7	72 33 50 100 71 93 17 92 100 0	38 24 12 28 18 67 272 140 84 ---	Japão	1982 a 1984	138
DON	trigo* cevada* aveia* trigo** cevada** aveia** grãos mistos**	8/14 2/14 0/13 23/29 1/6 3/6 4/11	57 14 0 79 17 50 36	400 120 --- 190 50 470 145	Suécia	1984	90

\* = Amostras colhidas no campo

\*\* = Amostras enviadas para controle higiênico



Na China, uma amostra de trigo com crosta (scab), coletada em 1976 em Shangai e relacionada com intoxicações caracterizadas por vômitos, revelou a presença de DON (9,76 mg/kg), T2 (0,74 mg/kg) e ZEA (0,03 mg/kg) (153).

Na França, Jemmali (56), analisando duas amostras de milho suspeitas de causarem infertilidade e sintomas de recusa alimentar em suínos, encontrou NIV (4,28 e 1,18 mg/kg), DON (0,6 e 0,14 mg/kg), T2 (0,02 mg/kg) e ZEA (10 e 2,5 mg/kg).

Marasas (66), examinando duas amostras de milho naturalmente contaminado, uma da África do Sul e outra da Zâmbia, relatou a existência de duas micotoxinas, DON e ZEA. Estas amostras foram selecionadas manualmente, escolhendo-se os grãos visivelmente infectados com fungo. Surto de estroginismo, recusa alimentar ou síndrome emética nunca foram registrados na África do Sul. No entanto, o trabalho demonstra que cepas locais de F. graminearum têm o potencial de produzir ZEA e DON sob condições apropriadas.

Outro estudo de incidência, realizado na Índia (15), mostrou que tricotecenos como DAS e T2 ocorrem naturalmente sob condições tropicais naquele país. Foram analisadas 87 amostras de amendoim, 84 de sorgo e 14 de milho, coletadas em Mysore no período de outubro de 1984 a setembro de 1985. A toxina T2 foi encontrada em 6,9% das amostras de amendoim em níveis de 0,177 a 38,89 mg/kg. Em duas amostras, foi detectada também a presença de DAS em níveis acima de 2 mg/kg. Dentre 84 amostras de sorgo, 4,8% apresentaram-se positivas para T2 em níveis de 1,67 a 15,0 mg/kg, enquanto que nenhuma amostra de milho mostrou-se positiva. A maior proporção de amostras positivas foi encontrada em produtos estocados por 13-24 semanas. Entretanto, nenhuma amostra es-

tocada por mais de 24 semanas produziu resultado positivo com relação às micotoxinas.

Mirocha *et al.* (77) e Rosen e Rosen (102) demonstraram que tricotecenos têm sido utilizados como arma de guerra biológica no sudoeste da Ásia. Análises da "chuva amarela", realizadas por estes pesquisadores, revelaram a presença de T2, DAS, DON e ZEA em concentrações de 48, 42, 58 e 265 mg/kg respectivamente.

A tabela 7 mostra alguns casos de incidência de tricotecenos em vários países a partir de 1982.

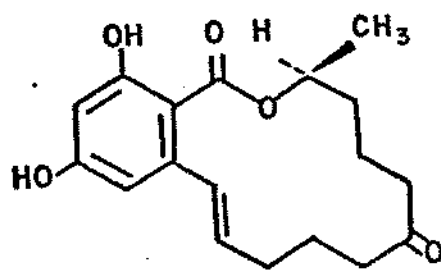
## 2.2 ZEARALENONA

### 2.2.1. ESTRUTURA QUÍMICA E ESTABILIDADE

Zearalenona, também chamada toxina F2, é uma lactona do ácido resorcílico com função estrogênica e promotora de crescimento (anabólica) (figura 2).

Apesar de ser uma lactona com um grande anel, compreendendo 13 carbonos, a zearalenona é surpreendentemente estável ao rompimento hidrolítico. Tal comportamento é atribuído à presença de um grupo metil secundário que impede que ataques nucleofílicos sejam efetivados na carbonila da lactona (75)

Experiências realizadas no NRRC (Northern Regional Research Center), EUA, têm mostrado que a ZEA é muito estável ao aquecimento e que não é afetada pelo processo de amônia desenvolvido para detoxificar milho contaminado com aflatoxina (13).



**FIGURA 2:** Estrutura da zearalenona (ZEA)

A ZEA é um sólido cristalino branco, insolúvel em água, tetracloreto de carbono, dissulfeto de carbono, solúvel em álcali aquoso, éter, benzeno, clorofórmio, cloreto de metila, acetato de etila, acetonitrila e álcoois, e fracamente solúvel em éter de petróleo (75)

## 2.2.2. MICROORGANISMOS PRODUTORES E CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO

A zearalenona é produzida por várias espécies de *Fusarium*, entre eles *F.roseum* (*F.graminearum*), *F.tricinatum* (*F.rose*, *F.sporotrichioides*), *F.oxysporum*, *F.moniliforme*, *F.solani*, *F.nivale*, *F.avanacium*, *F.sambucinum* e *F.culmorum* (110).

*F.roseum* parece ser a fonte mais importante de zearalenona natural nos Estados Unidos e *F.tricinatum* foi o produtor mais frequentemente isolado em um estudo realizado em cevada inglesa (110).

Espécies de *Fusarium* desenvolvem-se em grão armazenado quando a umidade é de 23% ou mais. O milho é geralmente invadido na estocagem, enquanto cevada, aveia e trigo são usualmente infectados ainda no campo, causando uma doença chamada crosta (scab) (79).

Em condições caracterizadas por alta umidade e baixas temperaturas, ou mesmo em dias quentes seguidos de noites frias, *F.roseum* produz grandes quantidades de zearalenona enquanto coloniza o grão (79). Entretanto, foram isoladas algumas cepas que dão origem a elevados teores de zearalenona à temperatura ambiente (73).

A umidade persistente é, provavelmente, um requisito para a infecção, promovendo a colonização dos grãos ao evitar a secagem das espigas a um nível suficiente para prevenir o crescimento de *F.grami-*

nearum (33). Esta umidade persistente é favorecida não somente pelas chuvas, mas também por condições que retardam a secagem, tais como solo de textura fina e de drenagem insuficiente (129).

A hipótese de que a exposição a baixas temperaturas seria um requisito para a biossíntese de zearalenona foi sugerida como parte da idéia de que as enzimas responsáveis pela produção desta micotoxina seriam ativadas a baixas temperaturas (72). Temperaturas estas que não são ótimas para o crescimento dos microorganismos envolvidos e que constituiriam uma condição de choque ("stress"). No entanto, estudos preliminares têm indicado que este choque térmico nem sempre é necessário para a produção máxima de zearalenona (129) e que esta resposta à temperatura varia, significativamente, com a cepa de F.graminearum utilizada (81).

### 2.2.3. TOXIDEZ

A zearalenona é um composto com propriedades estrogênicas que causa problemas de reprodução em animais, especialmente suínos. Estrogenismo, ou síndrome hiperestrogênica, é uma condição que pode ser caracterizada por uma ou mais das seguintes condições em fêmeas: inchaço e avermelhamento da vulva (vulvovaginite), inflamação uterina, aumento de secreção vaginal, prolapso vaginal e algumas vezes, retal. Também crescimento e lactação das glândulas mamárias podem ocorrer em machos imaturos ou castrados (71). Machos imaturos de suínos têm inicialmente uma maturação sexual acelerada, seguida da espermatogênese e perda de libido (106), além de atrofia dos testículos e aumento das glândulas mamárias.

Mirocha et al. (72) citam a possibilidade da ZEA causar aborto em fêmeas de suínos.

Zearalenona tem sido associada com hiperestrogenismo e outras desordens de ordem reprodutiva também em gado e aves.

A ingestão de ZEA pode causar infertilidade, mumificação fetal, natimortos, redução de tamanho e incoordenação dos membros posteriores (splaylegs) (145). Há pouca evidência de que dietas contaminadas com ZEA afetem o consumo de alimento ou ganho de peso, ou sejam uma causa direta de morte. Porém, a contaminação com ZEA é de particular importância para a agricultura e indústrias de alimentos por duas razões: 1º) a ingestão de ZEA por animais de criação causam perdas em termos de reprodução e saúde; 2º) resíduos de ZEA e seus metabólitos em alimentos de origem animal e vegetal são de interesse em termos de segurança de alimentos para consumo humano (142).

Os efeitos da ZEA em humanos não são conhecidos, mas dados de estudos em primatas indicam que os mesmos efeitos hormonais já descritos ocorrem. Quando administrado subcutaneamente em níveis de 14  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal, diminuiu níveis séricos do hormônio luteinizante em macacos Rhesus (46).

#### 2.2.4. INCIDÊNCIA

A zearalenona tem sido encontrada em milho, trigo, cevada, sorgo, feno, silagem, aveia, centeio, rações, semente de adlay (job's tears) e farinha de gergelim.

O milho tem sido o cereal mais freqüentemente implicado em casos de hiperestrogenismo em animais de criação, particularmente suí-

nos, e a ZEA tem sido detectada em milho no Canadá, Inglaterra, França, Rússia, EUA (13) além de milho colhido em Zâmbia, Lesotho e Swazilândia (1).

Nos EUA, alguns produtos relacionados com efeitos adversos em animais de criação e que continham ZEA foram cevada, sorgo e farinha de gergelim. A cevada contaminada foi implicada na mortalidade neonatal em suínos e diminuição da produção de ovos em aves. Concentrações de 2 a 12 mg/kg têm sido detectadas em sorgo associado com hiperestrogenismo em suínos (13). Shotwell *et al.* (116), analisando 180 amostras de soja em 1975, não encontraram nenhuma positiva para ZEA. Já entre 102 amostras de trigo, 19 apresentaram ZEA em níveis de 0,36 a 11 mg/kg. Em outro levantamento, realizado entre 1975 e 1976, Shotwell *et al.* (114) analisaram 197 amostras de sorgo em 10 estados dos EUA e encontraram 56 (28%) amostras positivas em níveis entre 200 e 6900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Na Coreia, em 1983, Tanaka *et al.* (136) encontraram dentre 28 amostras de cevada, 21 positivas com níveis de até 1581  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e dentre 18 amostras de trigo do Japão, obtiveram 100% de resultados positivos com níveis de 8 a 706  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Na cidade de Kobe, ainda no Japão, Tanaka *et al.* (138), em 1985, encontraram ZEA em 11% (3) das amostras de farinha de trigo analisadas (teor médio de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); em 100% (6) das amostras de farinha de cevada (teor médio de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e em 100% (7) das amostras de adlay (teor médio de 133  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Em outro levantamento, em 1978 no Japão, de 18 amostras de trigo, todas apresentaram-se positivas a níveis de 189  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (137).

De 31 amostras de trigo enviadas da Inglaterra, em 1984, Tanaka *et al.* (1986) encontraram 4 (13%) positivas, com teor médio de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (135).

## 2.3. METODOLOGIA ANALÍTICA

### 2.3.1. EXTRAÇÃO E LIMPEZA

Os métodos para determinação de micotoxinas constam de extração, seguida de limpeza para retirada de co-extrativos e quantificação através de algum tipo de sistema cromatográfico, seja ele gasoso, líquido ou de camada delgada.

Na tabela 8 estão os sistemas de extração e de limpeza mais conhecidos para as micotoxinas aqui em estudo.

Pathre e Mirocha sugerem, para a extração dos tricotecenos, o uso de solventes de polaridade intermediária como clorofórmio, acetato de etila e acetona para representantes do grupo A e solventes mais polares como metanol, metanol aquoso, acetonitrila aquosa e água para representantes do grupo B. Embora citem também que o acetato de etila e a acetonitrila sejam os solventes de escolha para extração de toxinas do grupo A, ressaltam que o acetato de etila resulta em um extrato que requer purificação extensiva (86).

Já Eppley (31), em um artigo de revisão, cita que o solvente de escolha para a extração de tricotecenos, na maioria dos métodos, é o metanol aquoso. Romer reporta que escolheu metanol:água (1:1) como solvente de extração para DAS e T2 porque esta solução tende a extrair compostos de polaridade dos tricotecenos enquanto não extrai compostos pouco polares como lipídios (100).



TABELA 8: Tipos de extração e limpeza para zearalenona e tricotecenos

MICOTOXINA	PRODUTO	EXTRAÇÃO	LIMPEZA	SISTEMA CROMAT.	REFERENCIA
DON, FUS X, NIV, T2, HT2, NEO, DAS	grãos, rações	Acetonitrila: água (89:16)	Coluna carvão: alumina: terra diatomácea	CCD	99
DAS, T2	milho, rações mistas	Metanol: água (1:1)	Clarificação anônia partição clorofórmio coluna sílica gel	CG	100
DAS, T2, HT2, DON, ZEA, FUS X	cereais	Acetato de etila Metanol: água (6:4)	Coluna sílica gel	CG	8
T2, ZEA + 9 micot.	cereais	Clorofórmio: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M (10:1)	Coluna terra diatomácea com NaHCO <sub>3</sub>	CCD	41
ZEA + 3 micot.	grãos	Metanol: água (10:2)	Desengorduramento n-hexano clarificação sulfato de zinco/ac. fosfotúng. partição diclorometano ou clorofórmio	CCDRE, CG	70,69
ZEA + 4 micot.	cereais	Clorofórmio: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 M (10:1)	Acidificação com HCl (pH 2-3)	CCD	38
DAS, T2, ZEA, DON, NIV, + 9 micot.	cereais	Acetato de etila Metanol	Desengorduramento éter de petróleo coluna sílica gel	CCDRE, CG	9
ZEA, T2 + 3 micot.	rações	Acetonitrila: KCl 4% (9:1)	Desengorduramento isooctano partição clorofórmio, diálise	CCD bidiv.	88
DAS, T2, ZEA + 9 micot.	rações	Acetonitrila: KCl 4% (9:1)	Desengorduramento isooctano partição clorofórmio, diálise	CCD	97
ZEA, HT2, T2, NEO	grãos	Acetato de etila: água (10:1)	Partição acetato de etila: clorofórmio (1:1) 3 colunas de sílica gel	CCD	83
DAS, T2, HT2, ZEA	milho	Metanol, 3 vezes	Desengorduramento n-hexano, cartucho de sílica gel C18 e de fase normal	CG	103
Toxina T2	milho	Metanol: água (1:1)	Clarificação clorato férrico Partição clorofórmio, CCD	CG	22
Toxina T2	milho	Acetato de etila	Desengorduramento n-hexano cartucho de sílica gel	CG	19
Tricotecenos	ração, grãos	Acetonitrila: água (5:1)	Desengorduramento éter de petróleo clarificação clorato férrico partição clorofórmio	CCD, CG	121, 122, 123
ZEA	milho	Acetato de etila	Coluna florisisil, coluna Kieselgel H	CCD, CG	6
DAS, T2, HT2	cereais	Metanol: água (1:1)	Clarificação sulfato de anônia partição acetato de etila, cartucho sílica gel, coluna tipo ciano	CG	21
DAS, T2	cultura fungo grãos	Metanol: água (1:1)	Coluna terra diatomácea cartucho sílica gel	CG	130

TABELA 8 (cont.)

MICOTOXINA	PRODUTO	EXTRAÇÃO	LIMPEZA	SISTEMA CROMAT.	REFERÊNCIA
ZEA + 4 micot.	milho, cevada aveia, trigo	Acetonitrila:KCl 4% (9:1)	Desengorduramento isoctano partição clorofórmio	CCD	128
ZEA + aflat.	milho	Metanol:água (6:4)	Desengorduramento n-hexano, partição clorofórmio, clarificação carbonato de cobre	CCD	140
ZEA + Ocrá	cereais	Clorofórmio:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 N (10:1)	Coluna sílica gel	CLAE	58
DAS, ZEA + 6 micot.	milho	Acetonitrila:HCl 1,25% (10:2)	Desengorduramento isoctano, coluna sílica gel	CCD	158
T2, DAS, DON, NIV	rações	Acetonitrila:água (9:1)	Coluna carvão:alumina:celite, coluna florissil coluna sílica gel	CG	101
T2, HT2, NEO, ZEA	cevada, aveia trigo	Acetato de etila	Partição acetato de etila:clorofórmio (1:1) Coluna sílica gel, CCD	CCAE, CG	53
T2, DAS, HT2, ZEA, NIV, DON, FUS X, NEO, butenidide, moniliformin	cereais grãos	Metanol:água (95:5)	Coluna amberlite MAD-4 coluna florissil	CCD, CG	59
DON, DAS, MAS, NEO, T2 ZEA	rações	Acetato de etila Metanol:água (4:6)	Partição acetonitrila:éter de petróleo desengorduramento éter de petróleo, clarificação gel férrico, CCD	CG	76
DAS, T2, HT2, NEO, MAS	alimentos rações	Acetato de etila Metanol:água (6:4)	Coluna sílica gel	CCD, CG	7
Toxina T2	leite	Acetato de etila	Partição n-hexano, CCD	CG	23
ZEA	milho, cevada	Acetato de etila	Partição NaOH 1 N, pH 9,5 partição clorofórmio, CCD	CCD, CG	79
DAS, DON, NEO, T2, ZEA	ração, milho	Acetato de etila Metanol	Partição éter de petróleo e metanol 33%	CG	131
T2, HT2	arroz	Acetonitrila:KCl 4%	Partição n-hexano e diclorometano cartucho de sílica gel C18	CLAE	107
ZEA, DON + 3 micot.	poeira, milho trigo, soja	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1N:clorato de metila (1:10) Acetonitrila:água (86:14)	Partição NaOH 1M, cartucho sílica gel (ZEA) Coluna alumina:carvão:celite, cartucho sílica gel C18 (DON)	CLAE	28
ZEA	milho, trigo sorgo	Acetonitrila:KCl 4% (9:1)	Desengorduramento isoctano partição clorofórmio	CCD	36
ZEA	cereais	Acetonitrila:água (3:1)	Desengorduramento n-hexano coluna florissil	CLAE	136
ZEA, Ocrat., aflat.	rações	Clorofórmio:água (10:1)	Coluna ou cartucho de sílica gel diálise e/ou extração alcalina	CCD, CLAE	51

TABELA 8 (cont.)

MICOTOXINA	PRODUTO	EXTRAÇÃO	LIMPEZA	SISTEMA CROMAT.	REFERÊNCIA
ZEA, zearalenol	milho	Clorofórmio:água (12,5:1)	Partição NaOH 2% e diclorometano	CLAE	14
ZEA	corn flakes	Metanol	Desengorduramento n-hexano partição em clorofórmio com variação de pH coluna sílica gel	CCD, CG CLAE	112
ZEA	cereais	Clorofórmio:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1N (10:1)	Coluna sílica gel partição clorofórmio com variação de pH	CLAE	80
ZEA, aflat., ocrat.	trigo, soja	Clorofórmio:água	Coluna sílica gel	CCD	116
T <sub>2</sub> , DAS, ZEA + 11 micot.	grãos	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20%:KCl 4%:aceto- nitrila (2:20:178)	Desengorduramento isoctano, partição clorofórmio, coluna sílica gel	CCD	132
T <sub>3</sub> , DAS, ZEA + 13 micot.	cereais rações mistas	Acetonitrila:KCl 4% (9:1)	Desengorduramento isoctano partição clorofórmio, dialise	CCD	37
ZEA	milho	Clorofórmio:água (10:1)	Lavagem com NaOH 4% e ác. cítrico partição benzeno	CLAE	154
ZEA, aflat.	milho	Metanol	Lavagem com Freon 13 e sulfato de amônia 20% partição clorobenzeno	CCD	113
ZEA, DON	grãos, cereais	Metanol:água (1:1)	Partição acetato de etila desengorduramento éter de petróleo coluna sílica gel	CCD, CG	12

NOTA: CCD= cromatografia em camada delgada; CG= cromatografia gasosa; CLAE= cromatografia líquida de alta eficiência  
CCDAE= cromatografia em camada delgada de alta eficiência

Alguns autores (7,8,9,131) citam um procedimento que requer duas extrações: o grupo A com acetato de etila e o grupo B com metanol aquoso.

A etapa de limpeza pode lançar mão de adsorção, partição ou precipitação (clarificação) de compostos interferentes. Podem ainda utilizar uma combinação destes princípios.

Dentre os agentes clarificantes utilizados para tricotecnos estão o gel férrico (22,76,121,122,123), sulfato de amônia (21,111), e carbonato de cobre básico (18). Para extratos contendo zearalenona são citadas a mistura de sulfato de zinco e ácido fosfotúngstico (69,70) e a mistura de cloreto de sódio, acetato de zinco e ácido acético glacial (47).

Outros clarificantes têm sido empregados para outras micotoxinas tais como acetato de chumbo neutro para aflatoxina B<sub>1</sub> (92) e ocratoxina A (65), mistura de ferrocianeto de potássio e acetato de zinco para ocratoxina (84) e sulfato de cobre também para ocratoxina (119).

Clarificantes são normalmente utilizados logo após a fase de extração. Alguns autores têm sugerido a utilização de clarificantes como carbonato de cobre (25,69,140,159) no extrato clorofórmico após uma etapa de limpeza por partição. Acredita-se que o carbonato de cobre adsorve ou forma complexos com pigmentos amarelos que se assemelham a quinóides (quinonas)(159).

Muitos sistemas de limpeza que empregam clarificantes incluem também partição como uma etapa adicional. Dois tipos de partição são comuns: a que é executada com solventes menos polares como n-hexano, isoctano, tolueno, etc, para desengorduramento do extrato e a que uti-

liza solventes de polaridade intermediária para transferência das micotoxinas até então contidas em um maior volume de solvente para um volume menor. Neste caso, temos uma forma de concentração além de limpeza (36,69,70,122).

A limpeza por partições sucessivas, para solventes com diferentes graus de acidez e basicidade, tem sido também sugerida (37, 108,112).

A adsorção para remoção de interferentes de extratos tem sido utilizada em minicoluna ou cartuchos, com adsorventes como florísil para zearalenona (136) e para aflatoxina (60) e terra diatomácea:carbonato de cobre II (2:1) para esterigmatocistina (35), além de vários tipos utilizados também para tricotecenos: sílica gel (8,9,51,83,100, 111,132,158), sílica gel e florísil (6,134), sílica gel de fase reversa (107) e de fase normal em conjunto com fase reversa (103), sílica gel e coluna tipo ciano (21), coluna de carvão:alumina:terra diatomácea (18,28,99,146,147) e terra diatomácea com NaHCO (41)

Romer (99) cita que a coluna de carvão:alumina:terra diatomácea adsorve compostos coloridos e fluorescentes. Testando-a para várias micotoxinas incluindo tricotecenos e zearalenona, com o eluente acetonitrila:água (84:16), observou que a ZEA assim como outras micotoxinas, como aflatoxina e ocratoxina, são retidas no carvão, supostamente pelo caráter aromático apresentado por estes compostos. Os compostos aromáticos são mais adsorvidos pelo carvão ativado do que compostos alifáticos de tamanho molecular similar. Os tricotecenos não sofrem este efeito. Trucksess *et al.* (147) a utilizaram com sucesso para DON.

### 2.3.2. QUANTIFICAÇÃO

Dentre os métodos para quantificação de micotoxinas temos cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além de outros métodos como RIA (RadioImmune Assay), ELISA (Enzyme linked Immunosorbent assay), métodos espectrofotométricos e métodos biológicos.

Os tricotecenos não são visíveis e não apresentam fluorescência que possa ser percebida sob luz UV, surgindo a necessidade de utilizar compostos chamados reveladores, que, após reagirem com estas micotoxinas, as tornem fluorescentes ou visíveis.

Dentre os reveladores utilizados em CCD e atualmente disponíveis no país encontramos o ácido sulfúrico (6,22,59,97,99), o cloreto de alumínio (59), o p-anisaldeído (41,53,83,121,124), o 2,4 dinitrofenil-hidrazina (41), o sulfato de césio (41), o ácido cromotrópico (10) e um sal de diazônio, o "fast violet B" (36)

Tem-se postulado que a ligação entre os átomos de carbonos 6 e 15 é quebrada oxidativamente pelo ácido sulfúrico de tal modo que o grupo hidroximetila é oxidado à formaldeído. O ácido cromotrópico reage com o formaldeído liberado dos tricotecenos após aquecimento com ácido e forma um corante monocatiônico (10).

O cloreto de alumínio forma quelatos fluorescentes com tricotecenos do grupo B. DAS e T2, que não formam quelatos, não são revelados por esta via.

Borrifando as placas com ácido sulfúrico ou solução de p-anisaldeído, os tricotecenos do grupo A exibem cores características. As toxinas do grupo B, devido ao seu sistema  $\alpha, \beta$  enona, produzem um ponto

marrom não fluorescente (117).

Takitani *et al.* (133) reportam que o ácido sulfúrico, o cloreto de alumínio e o p-anisaldeído têm uma fraca seletividade estrutural para o núcleo tricoteceno e sugerem um novo revelador, o 4(p-nitrobenzil)piridina (NBP). O nitrogênio piridínico do composto NBP ataca o epóxido e conjuga com a porção do carbono 12 do epóxido tricoteceno. Compostos, como os tricotecenos, ao perderem o grupo epóxido 12,13 não mais dão reação colorida com NBP, o que levou à conclusão que esta reação é específica para o grupo 12,13 epóxido no núcleo dos tricotecenos. Diepoxitricotecenos são negativos para a reação de cor com NBP.

Já em 1982, os mesmos autores (104) sugerem o uso de um novo revelador, a nicotinamida e 2-acetilpiridina, visto que o NBP apresenta certos defeitos como baixa estabilidade da cor e baixa sensibilidade.

Rao *et al.* (93) sugerem um novo revelador para tricotecenos, solução saturada de floroglucinol em ácido clorídrico concentrado, capaz de produzir manchas rosadas com estes compostos e que se intensificam com o tempo até 12 horas.

Yagen *et al.* (162) sugerem que os álcoois secundários dos tricotecenos reagem com sulfonil difenil indenona (Dis) produzindo Dis tricotecenos ésteres. Os pontos fluorescentes na placa são obtidos após borrifação do Dis derivado com um alcóxido sódico. Este derivado pode também ser utilizado em CLAE.

Após aplicação do extrato e o desenvolvimento da placa em solvente apropriado, a placa é borrifada com o revelador escolhido e é então aquecida por tempo e temperatura apropriados.

A placa é então submetida à luz UV de 245 e/ou 366 nm onde é feita a leitura de fluorescência emitida pela micotoxina pelo método do ponto de extinção, por comparação visual com o padrão ou densitometricamente. Os resultados obtidos densitometricamente são mais precisos que os obtidos visualmente (13, 83).

Beckwith e Stoloff (11), trabalhando com padrões, demonstraram que a estimativa visual em CCD apresentou coeficientes de variação em torno de 20%. Para medidas densitométricas, o coeficiente de variação obtido foi de 12%.

A detecção e quantificação de micotoxinas em cereais torna-se laboriosa quando o nível de contaminação é baixo. Esta dificuldade é própria da interferência de fundo de materiais extraídos com a micotoxina e que mascaram a fluorescência da toxina, em placas de CCD (13).

Horwitz et al. (50), examinando mais de 50 estudos colaborativos, observaram que para substâncias encontradas a níveis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e de 1  $\text{mg}/\text{kg}$ , os coeficientes de variação interlaboratoriais são da ordem de 32 e 16%, respectivamente. Já Nesheim (82) relata que os coeficientes de variação encontrados em estudos colaborativos têm variado entre 15 e 70%, com uma média em 30%. Campbell, por sua vez, estima que para resultados intralaboratoriais o coeficiente de variação em métodos que utilizam CCD deve variar de 10 a 35% mesmo em condições ideais (17).

Alguns autores utilizam a cromatografia bidimensional (88), embora Miguel e De Andres (69) achem-na dispendiosa e cara (1 amostra/placa) além de difundir as manchas. Citam que um segundo desenvolvimento da placa no mesmo solvente e na mesma direção melhora muito a separação e, embora requeira mais tempo, o trabalho não aumenta.



Ainda com relação ao desenvolvimento em CCD, alguns autores sugerem o prévio desenvolvimento da placa com a amostra em solventes tipo n-hexano (41), benzeno:n-hexano (3:1)(43) e clorofórmio (41), para que haja um pré deslocamento dos interferentes. Logo em seguida é feito o segundo desenvolvimento, agora no solvente de escolha, obtendo-se assim uma placa mais limpa, com menos interferentes.

A CCD tem sido o método de análise mais utilizado devido a sua grande especificidade, resultante da combinação de múltiplos sistemas solventes de desenvolvimento e reagentes de vaporização (reveladores). A sua desvantagem está no limite de detecção relativamente alto, quando comparado com CG (31).

Os limites de detecção com CG são cerca de 10 vezes mais baixos que os obtidos com CCD (tabelas 9 e 10).

**TABELA 9:** Limites de detecção encontrados em CCD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

DAS	T2	ZEA	Referência
4000	4000	1000	97
--	600	200	83
--	200	200	53
100-500	100-500	10-50	59
800	500	300-500	132
2400-2600	750-950	410-500	37
800	500	---	99

TABELA 10: Limites de detecção conseguidos em CG ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

DAS	T2	ZEA	Referência
5	20	1	103
100	100	---	21
25	100	---	100
200	200	---	130
---	50	50	53
80-200	80-200	100	59
50-100	50-100	50-100	131
---	5	---	19, 22

Os tricotecenos são insuficientemente voláteis para passar através de uma coluna de cromatografia gasosa. A derivação nas funções hidroxilas destes resulta em derivados voláteis, tais como trimetilsilil éter ou trifluoroacetil ésteres (19), permitindo sua separação.

Na determinação com detector de ionização de chama (DIC), alguns reagentes utilizados na reação de derivação incluem: N,O bis trimetilsilil acetamida (BSA) (39, 53) e N trimetilsililimidazol (TMSIM).

Mirocha *et al.* (79) comentam que o uso de derivados TMS em CG freqüentemente resulta em deposição de sílica no DIC, causando um ruído excessivo e baixa sensibilidade e reprodutibilidade.

Já com detector de captura eletrônica (DCE), a derivação é feita com heptafluorobutiril (62), heptafluorobutil imidazol (HFBI)

(21,111,130), trimetilclorosilano (TMCS) e pentafluoropropionil (PFPA) (101).

Scott (109) e Romer *et al.* (100) citam que a sensibilidade do DCE é muito superior à do DIC. Kamimura *et al.* (59) reportam limite de detecção, tanto para DAS como para T2, de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  no DIC e 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  no DCE.

Alguns autores (21,24,101,130,131) citam o uso de coluna capilar para a detecção de tricotecenos, salientando a superioridade da separação dos componentes da amostra em comparação com a obtida com colunas empacotadas.

A CG permite detecção e quantificação da maioria dos tricotecenos exceto as verrucarinas e roridinas; porém, Krishnamurthy e Sarver (62) citam um método de análise por CG/EM (espectrometria de massa) para determinação de verrucarinas e roridinas, envolvendo a conversão destes compostos aos seus álcoois correspondentes por hidrólise alcalina, seguida de derivação com heptafluorobutiril imidazol. Deve-se observar que este método detecta somente a quantidade de verrucarols no hidrolisado sem identificar o tricoteceno macrocíclico que pode ser roridina, verrucarina ou satratoxina.

A análise de zearalenona por CG também requer uma derivação. Os agentes mais comuns usados para ZEA são os derivados trimitilsilil (TMS) (53), derivados dimetoxi e derivados metioxima (79). Estes compostos são prontamente detectados com DIC. Holder *et al.* (48) reportam a detecção do derivado pentafluoropropionil de ZEA com DCE.

Cabe ressaltar que a derivação não elimina a possibilidade de uma identificação incorreta, devido a componentes que podem apresentar idênticos tempos de retenção. A separação por CCD antes da análise por

CG parcialmente supera este problema (160). Mirocha *et al.* (74) ressaltam esta possibilidade quando reportam que junto com o TMS derivado para T2 pode aparecer um interferente com o mesmo tempo de retenção que T2. Este interferente seria um glicerilmono oleato ou um glicerilmono linoleato. Para evitar este resultado falso positivo, recomendam um prévio desenvolvimento em CCD (cromatografia preparativa) com clorofórmio:metanol (98:2) ou derivação com N trifluoroacetil acetamida e pentafluoropropionil imidazol, onde os derivados monoglicéricos apresentam um tempo de retenção diferente do derivado de T2. Ainda atentos a este problema encontramos Shotwell *et al.* (116) que relatam que o extrato de trigo contém um alquil resorcinol que interfere com a quantificação de ZEA por CG.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido utilizada para ZEA (13). As verrucarinas e roridinas, por possuírem absorvância no UV, também podem ser determinadas por este método (30,68).

Os métodos que utilizam CLAE para determinação de ZEA apresentam sensibilidade variável, dependendo do processo de purificação e do material analisado. Os limites de detecção relatados vão de 5 a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (13).

Dentre os detectores utilizados para ZEA e para tricotecenos estão o detector de fluorescência utilizado para ZEA (136) e zearalenol (14); o detector de ultravioleta utilizado para ZEA (28,80,154) e DON (28) e o refratômetro diferencial utilizado na determinação de T2 e HT2 (107).

Yagen *et al.* (162) citam um método em CCD e CLAE (detector UV) para tricotecenos após reação com sulfonil difenil indenona (Dis).

Os limites dos Diterpínicos éster formados estão, em CCD, entre 20 e 25 ng/ponto para DAS, T2 e HT2 e em CLAE 30 ng/injeção para T2 e DAS e 200 ng/injeção para HT2.

### 2.3.3 CONFIRMAÇÃO

Análises de micotoxinas são, freqüentemente, complicadas pela presença de compostos de comportamento cromatográfico a elas semelhantes. Estes compostos interferentes estão presentes em extratos de origem vegetal e culturas fúngicas. Para prevenir resultados positivos falsos, a utilização de derivações químicas ou espectrometria de massa são recomendadas (38).

Grabarkiewicz *et al.* (41) argumentam que os testes de confirmação para zearalenona, e que podem ser estendidos a outras micotoxinas, são divididos em dois passos: 1º) Confirmação preliminar: valor de Rf, cor da fluorescência e sua mudança após tratamento com reveladores, cromatografia com padrões internos e cromatografia bidimensional; 2º) Testes de confirmação química: formação de derivados das micotoxinas.

Vários trabalhos citam diversos sistemas solventes para desenvolvimento em CCD e vários reveladores (26,40) e os dados assim obtidos podem servir como dados corroborativos na identificação dos tricotecenos e ZEA. Alguns autores, entretanto, citam a avaliação destes resultados como suficientemente conclusivos em termos de confirmação (36,37,59).

Nas tabelas 11 e 12 temos os métodos presentemente relatados para a confirmação de ZEA e tricotecenos.

**TABELA 11:** Enfoques utilizados para confirmação de zearalenona

Confirmação	Método	Referência
Desenvolvimento em mais de um solvente	CCD	48,70
Reação química	CCD	9,41,51,52,105
Diversos reveladores	CCD	79
Teste em pele de coelho + CG	CCD	97
Diferentes reveladores e solventes	CCD	36,37,69
Diferentes $\lambda$ , comparação com padrão	CLAE	51,80,154
Co-cromatografia	CG	14,32
Espectrometria de massa	CG	77,78,101,112,116,136
CCD de fase reversa	CCD	95

**TABELA 12:** Enfoques utilizados para confirmação de tricotecenos

Confirmação	Método	Referência
CCD fase reversa e reveladores	CCD	99
Tempo de retenção, comparação com padrão	CG	99,139
Vários sistemas solventes e reveladores	CCD	31,37,59
Espectrometria de massa	CG	19,21,22,76,77, 78,94,103,121
Reações químicas	CG, CCD	7,9,52,122
Biológicos Teste em pele de coelho + CG	CCD	97
Teste em embrião de galinha	CCD	121,123,124

Algumas reações químicas dos tricotecenos são descritas na literatura (tabela 13). Stahr *et al.* (122) sugerem que acetilação em vidro poderia vir a ser usada para confirmação de tricotecenos em CCD e CG. A técnica preferida para confirmação destes compostos tem sido espectrometria de massa (77, 94,103,121).

**TABELA 13:** Reações químicas para ZEA e tricotecenos

Reação	Micotoxina	Reagentes	Referência
Acetilação	ZEA	Ac <sub>2</sub> O + piridina	38
Acetilação	tricotecenos	Ac <sub>2</sub> O + piridina	42,122,126,157
Esterificação	ZEA	Ac <sub>2</sub> O	38
Hidrogenação	ZEA	MeOH + NaBH <sub>4</sub>	105
Hidrólise	tricotecenos	Sol.sat.Ba(OH) <sub>2</sub> em MeOH	122
Hidrólise	tricot.(T2)	KOH 0,01 N em MeOH	157
Hidrólise	tricot.(DAS)	NH <sub>4</sub> OH 1 N em MeOH	42,126,157
Hidrólise	tricot.(T2)	NaOH 0,3 N em EtOH	52,126

Ac<sub>2</sub>O= anidrido acético, MeOH= metanol, NaBH<sub>4</sub>= boroidreto de sódio

As toxinas T2, HT2 e NEO dão, após hidrólise, T2 tetraol; DAS e MAS dão scirpentriol; e DON e FUS X dão nivalenol (9). Bata *et al.* citam uma hidrólise realizada com metilato de sódio e neutralizada com HCl:metanol. As amostras são analisadas por CCD e CG antes e após a reação. Observando-se os diferentes Rfs e Trs (tempo de retenção) tem-se um resultado confirmatório (7).

No caso da ZEA, dentre as reações de derivação (tabela 13), a de acetilação foi empregada por Golinski e Grabarkiewicz-Szczesna para confirmação (38).

#### 2.3.4. OUTROS MÉTODOS

Os tricotecenos não contêm grupos funcionais que absorvam no UV e no visível. Até o momento, reagentes adequados e sensíveis para medidas colorimétricas não foram desenvolvidos. Uma tentativa nesta direção foi feita por Kato *et al.* (61) que determinaram FUS X e T2 baseados na reação do ácido cromotrópico ou ácido fenil J com o formaldeído liberado dos tricotecenos quando estes são aquecidos com ácido sulfúrico. O método espectrofotométrico, resultante da reação com ácido cromotrópico, demonstrou uma sensibilidade entre 330 e 1200 mg/L. Com ácido J originou um método fluorimétrico com sensibilidade entre 1,25 e 25 mg/L. O inconveniente destes métodos é o grande número de substâncias que podem interferir, fazendo-se necessária uma limpeza exhaustiva quando de sua aplicação em produtos agrícolas.

Dentre os métodos biológicos, o teste de toxidez dérmica em ratos e coelhos, o teste de inibição de síntese protéica em reticulócitos de coelho e o teste de citotoxicidade são os mais utilizados (30). Estão baseados no fato de que os tricotecenos possuem grande toxidez dérmica e estão incluídos entre os maiores agentes citostáticos. Embora estes métodos sejam muito sensíveis (10-30 ng), perdem em especificidade (32). Outros compostos que apresentem as mesmas reações em animais podem interferir, resultando em falsos positivos.

Romer (98) sugere que a análise química seja feita após o re-



sultado positivo do método em pele de coelho, utilizando assim o método biológico como triagem.

Métodos que utilizam técnicas imunológicas como ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) e RIA (RadioImuno Assay) têm sido utilizados também para tricotecenos. Pestka *et al.* (89) citam um método de ELISA para toxina T2, e Lee e Chu (63) um método de RIA para T2, ressaltando o problema de ligações cruzadas entre anticorpos e compostos estruturalmente relacionados. Autores relatam que, embora ambos sejam simples, de fácil execução na bancada, e demonstrem boa especificidade, o ELISA apresenta vantagens sobre o RIA tais como: menor tempo de análise, ausência de equipamentos para radiação e estabilidade maior dos reagentes (89). O ELISA, embora sensível e específico, leva a desvantagem no desenvolvimento dos anticorpos específicos para uma toxina em particular, o que usualmente consome alguns anos (117).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. PADRÕES DE MICOTOXINAS

As micotoxinas utilizadas foram zearalenona, diacetoxiscirpenol, toxina T2, roridina A e verrucarina A, todas fornecidas pela Markor. A diluição foi feita com benzeno. A quantificação dos tricoteceenos foi realizada por diferença de peso enquanto que a da zearalenona foi determinada espectrofotometricamente (317 nm).

#### 3.2. AVALIAÇÃO DE REVELADORES

Primeiramente, foram avaliados diversos reveladores a fim de definir o mais apropriado para sua posterior utilização nos métodos a serem testados.

Reveladores e tempo de estufa e temperatura necessários:

- a. Cloreto de alumínio 20% em etanol (10 minutos a 110°C)
- b. Ácido sulfúrico 20% em metanol (10 minutos a 120°C)
- c. Sulfato de céσιο, 1% em ácido sulfúrico 6N (10 a 20 minutos a 110°C)
- d. 2,4 dinitrofenil-hidrazina (10 a 20 minutos a 110°C)

0,5g de 2,4 dinitrofenil-hidrazina dissolvidos em uma mistura de 3,75 mL de ácido sulfúrico concentrado, 37,5 mL de etanol e 85 mL de água.

- e. ácido cromotrópico (5 a 10 minutos a 110°C)  
1 parte de solução aquosa de ácido cromotrópico a 10% e 5 partes de ácido sulfúrico:água (5:3). Validade: 3 a 4 semanas
- f. p-anisaldeído (20 minutos a 110°C)  
0,5 mL de p-anisaldeído  
5 mL de ácido sulfúrico  
10 mL de ácido acético glacial  
400 mL de metanol
- g. Fast violet B  
0,7g de fast violet B em 100 mL de água. Conservar no refrigerador no máximo 5 dias.  
Borrifar as placas com solução de fast violet B. Borrifar a seguir com solução tampão pH 9 (50 mL de borato de sódio 0,025M e 4,6 mL de HCl 0,1M) até a camada de sílica gel ficar úmida. Secar em corrente de ar cerca de 5 a 10 minutos e observar à luz visível. Borrifar então as placas com ácido sulfúrico 50% e aquecer 5 minutos a 120°C e observar à luz visível.

O limite de detecção de cada micotoxina foi determinado tanto no visível como no UV. A avaliação foi executada com padrões que foram diluídos conforme a necessidade até a menor quantidade visível na placa, e esta quantidade foi tomada como o limite de detecção.

Cada revelador, após evaporação do sistema solvente empregado no desenvolvimento, foi borrifado sobre a placa. Cada placa foi então aquecida por tempo e temperatura indicados em literatura, e acima descritos. As cores resultantes da ação dos reveladores sobre as micoto-

xinas foram observadas à luz visível e à luz UV de 366nm e registradas para possível uso posterior na confirmação.

### 3.3. TESTE DE SISTEMAS SOLVENTES PARA DESENVOLVIMENTO SIMULTANEO DE DIACETOXISCIRPENOL, TOXINA T2, RORIDINA A, VERRUCARINA A E ZEARALENONA EM CAMADA DELGADA.

Foram avaliados os seguintes sistemas solventes com relação à sua habilidade em separar as micotoxinas em estudo:

01. Clorofórmio:metanol (93:7)
02. Clorofórmio:metanol (97:3)
03. Clorofórmio:metanol (99:1)
04. Clorofórmio:etanol (5:95)
05. Clorofórmio:éter de petróleo (3:1)
06. Clorofórmio:acetona:n-hexano (7:2:1)
07. Clorofórmio:acetona:2 propanol (85:10:5)
08. Clorofórmio:metanol:ácido acético (91:8:1)
09. Benzeno:acetona (1:1)
10. Benzeno:acetona (2:1)
11. Acetona:n-hexano (2:3)
12. Acetona:n-hexano (1:2)
13. Acetona:n-hexano (2:5)
14. Acetona:n-hexano (1:1)
15. Acetato de etila:n-hexano (2:1)
16. Acetato de etila:n-hexano (5:1)
17. Tolueno:acetato de etila (1:3)
18. Tolueno:acetato de etila:acetona (3:2:1)

19. Tolueno:acetato de etila:acetona (2:3:1)
20. Tolueno:acetato de etila:acetona (4:2:1)
21. Tolueno:acetato de etila:acetona (2:2:1)
22. Tolueno:acetona:metanol (5:3:2)
23. Acetona:acetato de etila:etanol (4:4:1)
24. n-Hexano:tetracloroeto de carbono:acetato de etila (2:10:1)
25. Tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico 86% (100:50:50:0,5)
26. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (6:3:1)
27. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (60:40:0,5)
28. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (10:9:1)
29. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (50:50:2,5)
30. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (50:50:0,5)
31. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (75:25:0,5)

A avaliação foi realizada com padrões aplicados em placa, em pontos isolados e desenvolvidos no sistema em estudo e, após revelação com ácido sulfúrico, os  $R_f$  foram medidos e registrados.

#### 3.4. PREPARO DE AMOSTRAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS.

Para avaliação da aplicabilidade dos métodos a serem testados foram utilizadas amostras artificialmente contaminadas preparadas com fubá amarelo. A quantidade de padrão desejada foi gotejada sobre 50g de fubá, evitando que a solução atingisse as paredes do recipiente, e deixada evaporar de um dia para outro.

### 3.5. VERIFICAÇÃO DA APLICABILIDADE DO MÉTODO SOARES-AMAYA PARA TRICO-TECENOS.

O método Soares-Amaya é utilizado para determinação de aflatoxinas, ocratoxina, esterigmatocistina e zearalenona em milho e outros grãos (118). Foram feitas tentativas no sentido de utilizá-lo também para determinação das micotoxinas aqui em estudo. O método é descrito a seguir.

Transferir para um copo de liquidificador 50g da amostra, 270 mL de metanol e 30 mL de KCl 4% e homogeneizar por 5 minutos. Filtrar em funil de vidro com papel de filtro qualitativo pregueado. Transferir 150 mL do filtrado para bequer de 600 mL e adicionar 150 mL de solução de sulfato de amônia a 30% e 50 cm<sup>3</sup> de celite no caso do milho (e 150 mL de solução de sulfato de cobre 10% e 50 cm<sup>3</sup> de celite, no caso de amendoim). Agitar, deixar sedimentar e filtrar novamente em papel de filtro qualitativo pregueado.

Transferir 150 mL deste filtrado para funil de separação de 500 mL, adicionar 150 mL de água destilada e proceder a duas extrações com 10 mL de clorofórmio cada. Recolher 5 mL de cada extração, juntar estes extratos e evaporá-los à secura em banho-maria, guardando-os para posterior quantificação em camada delgada (vide item 3.6.1.4).

### 3.6. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MÉTODOS

#### 3.6.1. MILHO

### 3.6.1.1. PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO E LIMPEZA

Para um copo de liquidificador foram transferidos 50g da amostra, 270 mL de metanol e 30 mL de KCl 4%. Após 5 minutos de homogeneização, a mistura foi filtrada em funil de vidro com papel de filtro qualitativo pregueado.

Uma alíquota de 150 mL foi transferida para um béquer de 600 mL onde foram adicionados os clarificantes em estudo (geralmente 150 mL) e 50 ou 150 cm<sup>3</sup> de celite (conforme a necessidade).

Após filtração em papel pregueado qualitativo, 150 mL do extrato foram transferidos para um funil de separação onde 150 mL de água foram adicionados.

O desengorduramento foi levado a cabo duas vezes com 50 mL de n-hexano, acompanhado de leve agitação por um minuto. A seguir foram realizadas duas extrações com 10 mL de clorofórmio, com agitação por dois minutos. De cada extração, foram retirados 5 mL e reunidos em um frasco pequeno de vidro âmbar. O extrato foi levado à secura em banho-maria e redissolvido em 200  $\mu$ L de benzeno para posterior quantificação em placa.

#### 3.6.1.1.1. CLARIFICANTES

Dois procedimentos diferentes foram testados para clarificação do extrato de milho. No primeiro procedimento, eram adicionadas quantidades suficientes de uma das soluções clarificantes a 150 mL do filtrado proveniente da extração do milho com metanol:KCl 4% (9:1).

Ambos (tipo de clarificante e volumes empregados) estão listados abaixo:

- a. Sulfato de amônia 30% (150 mL)
- b. Ferrocianeto de potássio 0,25M e acetato de zinco (1,0M contendo 20 mL de ácido acético glacial/litro) (15 mL + 15 mL)
- c. Acetato de chumbo 20% (150 mL)
- d. Acetato de zinco (150g de acetato de zinco, 150g de NaCl, 1 mL de ácido acético glacial e água necessária para 1 litro) (150 mL)
- e. Sulfato de zinco (150g de sulfato de zinco, 50g de ácido fosfotúngstico e 1000 mL de água) (150 mL)
- f. Gel férrico (2g de cloreto férrico em 30 mL de água, adicionados à 170 mL de NaOH 0,2N) + 1,0g de carbonato de cobre básico (200 mL)

Uma segunda maneira de proceder à avaliação foi adicionar 0,5g de um dos clarificantes listados abaixo, sob a forma de pó, ao extrato clorofórmico. Este extrato clorofórmico era proveniente da partição que tem lugar após uma clarificação com sulfato de amônia e desengorduramento com n-hexano. O extrato clorofórmico foi, a seguir, filtrado com auxílio de celite. Uma alíquota de 20 mL foi levada a evaporar para aplicação posterior na camada delgada.

- a. Carbonato de cobre
- b. Sulfato de cobre
- c. Cloreto férrico
- d. Sulfato de cálcio



### 3.6.1.1.2. MINICOLUNAS PARA LIMPEZA

Foram testados vários adsorventes (tabela 14) empacotados em coluna de vidro com 1 cm de diâmetro interno, 1,5 cm de diâmetro externo, 28 cm de comprimento, com colo de 6 cm. A quantidade de adsorvente empregada foi de 0,5g e acondicionada entre duas camadas de sulfato de sódio anidro, colocadas sobre lâ de vidro.

A coluna de vidro, foi adicionada lâ de vidro de tal maneira que não permitisse passagem de material sólido e, em seguida, uma camada de 1 cm de sulfato de sódio anidro.

Para empacotar a coluna, uma pequena quantidade de n-hexano foi misturada ao adsorvente e esta suspensão foi então introduzida na coluna. A coluna foi lavada com sucessivas porções de n-hexano de tal maneira que o adsorvente ficasse na parte inferior. Uma camada de sulfato de sódio anidro (cerca de 2,5 cm) foi depositada na parte superior. Quando o n-hexano chegava ao topo da camada de sulfato, o extrato era então aplicado. Cuidados foram tomados de maneira a não permitir que a coluna secasse.

Os extratos clorofórmicos evaporados foram redissolvidos em pequena quantidade de benzeno (cerca de 1 mL) e introduzidos na minicoluna, após o que eram eluídos com um solvente também sendo testado. A fração eluída era então evaporada à secura em banho-maria e redissolvida para aplicação posterior em placa.

**TABELA 14:** Adsorventes e solventes de eluição utilizados na limpeza do extrato de milho\*

Adsorvente	Solvente
Hyflosupercel:MgO (4:1)	Benzeno:acetona (1:1)
Hyflosupercel:MgO (4:1)	Clorofórmio:metanol (97:3)
Hyflosupercel:MgO (2:1)	Benzeno:acetona (1:1)
Hyflosupercel:MgO (2:1)	Clorofórmio:metanol (97:3)
Sílica gel (1% umidade)	Benzeno:acetona (1:1)
Sílica gel (1% umidade)	Clorofórmio:metanol (97:3)
Alumina	Clorofórmio:metanol (97:3)
Florisil	Benzeno:acetona (1:1)
Florisil	Clorofórmio:metanol (97:3)
Celite com NaHCO <sub>3</sub> 1,25%**	Clorofórmio
Celite com CuSO <sub>4</sub> 10%**	Clorofórmio
Hyflosupercel:MgO (4:1)***	Clorofórmio
Hyflosupercel:MgO (4:1)***	éter etílico
Hyflosupercel:MgO (4:1)***	éter etílico:clorofórmio (1:1)

\*= O extrato de milho foi obtido por extração com metanol:KCl 4% (9:1), clarificação com sulfato de amônia 30%, desengorduramento com n-hexano e partição para clorofórmio.

\*\*= Celite 545, acid washed

\*\*\*= Ativado 100°C, 2 horas.

### 3.6.1.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA LIMPEZA DO EXTRATO

A eficiência da limpeza foi avaliada segundo os seguintes critérios: (a) ausência de "streaking" (faixa de impurezas que mancha a placa do ponto de aplicação da amostra até a frente do solvente) e (b) ausência de manchas adicionais na placa quando esta era revelada com ácido sulfúrico.

### 3.6.1.3. MÉTODO DESENVOLVIDO PARA MILHO

O procedimento desenvolvido para determinação de tricotecenos e zearalenona, em milho, está descrito a seguir.

Para um copo de liquidificador transferir 50g da amostra, 270 mL de metanol e 30 mL de KCl 4%, homogeneizar 5 minutos em baixa velocidade e filtrar em funil de vidro com papel de filtro qualitativo pregueado.

Transferir 150 mL do filtrado da extração para um béquer de 600 mL já contendo 200 mL de gel férrico (preparado como descrito em 3.6.1.1.1.f) e adicionar 150 cm<sup>3</sup> de celite e 1,0g de carbonato de cobre básico. Agitar e deixar sedimentar. Filtrar em papel pregueado qualitativo e transferir 150 mL deste filtrado para um funil de separação de 500 mL. Adicionar 150 mL de água destilada e proceder ao desengorduramento com duas vezes 50 mL de n-hexano e um tempo de agitação de 1 minuto (utilizando-se de dois funis pois o n-hexano a ser desprezado fica na parte superior da solução) e depois do segundo desengorduramento lavar o funil com 10 mL de metanol para evitar que ha-

ja perdas nesta etapa.

A seguir, fazer duas extrações com 10 mL de clorofórmio e um tempo de agitação de 2 minutos. De cada extração, retirar 5 mL e reuni-los em frasco pequeno de vidro âmbar. Evaporar o extrato em banho-maria até a secura e redissolver em 200  $\mu$ L de benzeno para posterior quantificação em placa.

#### 3.6.1.4. QUANTIFICAÇÃO

A quantificação foi realizada por CCD através de comparação visual com padrões, utilizando placas de sílica gel 60G com 0,25 mm de espessura, preparadas no laboratório e não ativadas.

Os extratos secos foram redissolvidos em 200  $\mu$ L de benzeno, ou outro volume conveniente, e agitados em ultra-som por 30 segundos, para uma melhor solubilização.

Na mesma placa, foram aplicados: 3 e 5  $\mu$ L do extrato e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7  $\mu$ L dos padrões, nas seguintes concentrações: T2= 68  $\mu$ g/mL, DAS= 116,67  $\mu$ g/mL, VER A= 76  $\mu$ g/mL e ZEA= 8  $\mu$ g/mL. Quando necessário para auxiliar a identificação, foi feita co-cromatografia.

A placa foi desenvolvida em tolueno:acetato de etila: ácido fórmico 86% (6:3:1) e após secar naturalmente foi vaporizada com ácido sulfúrico 20% em metanol e aquecida a 130°C por 5 minutos para visualização da zearalenona, e por 15 minutos para visualização de DAS, T2 e VER A.

A placa ainda quente foi examinada sob luz ultravioleta de 366 nm. A intensidade das manchas suspeitas de mesma tonalidade e Rf

do padrão correspondente foram comparadas visualmente com as manchas dos padrões.

A ROR A não foi aplicada na mesma placa que os outros padrões, visto que seu Rf coincide com o da toxina T2 no sistema solvente acima citado. Se a mancha suspeita apresentava o Rf de T2, era realizada a avaliação visual para a quantificação. Uma nova placa era aplicada e desenvolvida em acetato de etila:n-hexano (2:1). Se o Rf coincidia com o da ROR A, e não com o de T2, era feita nova quantificação agora com 1 a 7  $\mu$ L de ROR A (66  $\mu$ g/mL) da mesma maneira como citado acima. Neste caso, a primeira quantificação era desprezada.

### 3.6.2. FEIJÃO, ARROZ E SOJA

#### 3.6.2.1. PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO E LIMPEZA

As amostras foram moídas até uma granulometria de 20 mesh e preparadas como descrito para o milho, no item 3.6.1.1.

O clarificante gel férrico com carbonato de cobre básico, utilizado no procedimento desenvolvido para o milho, foi também avaliado para estes produtos. Paralelamente, foram testadas minicolunas de Hyflosupercel:MgO (4:1) ativado a 100°C por 2 horas, com os seguintes solventes para eluição: éter etílico, éter etílico:clorofórmio (1:1) e clorofórmio, utilizando como clarificante o sulfato de amônia 30%, com a finalidade de verificar a eficiência deste adsorvente na limpeza do extrato (tabela 15).

TABELA 15: Sistemas de limpeza testados para feijão, arroz e soja\*

Material	Clarificante	Minicoluna	
		Hyflo:MgO (4:1)**	solvente de eluição
Feijão	Sulfato de amônia	+	Et <sub>2</sub> O:CHCl <sub>3</sub> (1:1)
Feijão	Sulfato de amônia	+	Et <sub>2</sub> O
Feijão	Sulfato de amônia	+	CHCl <sub>3</sub>
Feijão	Gel férrico/carbonato de cobre básico	-	-----
Soja	Sulfato de amônia	+	Et <sub>2</sub> O:CHCl <sub>3</sub> (1:1)
Soja	Sulfato de amônia	+	Et <sub>2</sub> O
Soja	Sulfato de amônia	+	CHCl <sub>3</sub>
Soja	Gel férrico/carbonato de cobre básico	-	-----
Arroz	Sulfato de amônia	+	Et <sub>2</sub> O:CHCl <sub>3</sub> (1:1)
Arroz	Sulfato de amônia	+	Et <sub>2</sub> O
Arroz	Sulfato de amônia	+	CHCl <sub>3</sub>
Arroz	Gel férrico/carbonato de cobre básico	-	-----

\*= Após extração com metanol:KCl 4% (9:1), o filtrado foi submetido à ação do clarificante, seguido de desengorduramento com n-hexano e partição para clorofórmio, para depois ser submetido ou não à minicoluna.

\*\*= Ativado 100°C por 2 horas, +: indica a utilização da minicoluna, -: indica a não utilização da mesma.

### 3.6.2.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA LIMPEZA DO EXTRATO

Foram mantidos os critérios estipulados para o milho, citados no item 3.6.1.2.

### 3.6.2.3. MÉTODO DESENVOLVIDO PARA FEIJÃO, ARROZ E SOJA

O procedimento desenvolvido para determinação, e quantificação, de tricotecenos e zearalenona em milho foi mantido também para estes produtos.

### 3.6.3. TRIGO

#### 3.6.3.1. PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO E LIMPEZA

Para o trigo, foram avaliados todos os clarificantes já testados para o milho, além do sulfato de cobre 10% e sulfato de cálcio 10%.

Foram verificados também vários adsorventes em minicoluna, empacotados como descrito em 3.6.1.1.2 (tabela 16)

A minicoluna de carvão:celite:alumina foi preparada com alumina neutra, carvão ativo e celite "acid washed 545" (2).

TABELA 16: Minicolunas testadas para o trigo\*

Clarificante	Adsorvente	Solvente de eluição
Gel férrico/carbonato de cobre básico	Sílica gel	CHCl <sub>3</sub>
Gel férrico/carbonato de cobre básico	Alumina (15% umidade)	CHCl <sub>3</sub>
Gel férrico/carbonato de cobre básico	Florisil	CHCl <sub>3</sub>
Gel férrico/carbonato de cobre básico	Alumina:carvão:celite (0,5:0,7:0,3)	CHCl <sub>3</sub>
Acetato de zinco	Sílica gel	CHCl <sub>3</sub>
Sulfato de amônia	Hyflosupercel:MgO (4:1)**	Et <sub>2</sub> O
Sulfato de amônia	Hyflosupercel:MgO (4:1)**	Et <sub>2</sub> O:CHCl <sub>3</sub> (1:1)
Sulfato de amônia	Hyflosupercel:MgO (4:1)**	CHCl <sub>3</sub>
Sulfato de cobre	Hyflosupercel:MgO (4:1)**	Et <sub>2</sub> O
Sulfato de cobre	Hyflosupercel:MgO (4:1)**	Et <sub>2</sub> O:CHCl <sub>3</sub> (1:1)
Sulfato de cobre	Hyflosupercel:MgO (4:1)**	CHCl <sub>3</sub>

\*= Extrato obtido após extração com metanol:KCl 4% (9:1), precipitação com os clarificantes indicados, desengorduramento com n-hexano e partição para clorofórmio.

\*\*= Ativado 100°C, 2 horas



### 3.6.3.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA LIMPEZA DO EXTRATO

Foram mantidos os critérios estipulados para o milho, citados no item 3.6.1.2.

### 3.6.3.3. MÉTODO DESENVOLVIDO PARA TRIGO

Para determinação dos tricotecenos em trigo, seguir o mesmo método que para o milho até a obtenção do extrato clorofórmico. A partir daí, adicionar uma etapa de limpeza utilizando minicoluna de carvão:celite:alumina.

Introduzir o extrato clorofórmico obtido (10 mL) em uma minicoluna com as mesmas especificações descritas em 3.6.1.1.2., contendo 1,5g da mistura carvão:celite:alumina (0,7:0,3:0,5), empacotada a seco, sobre lâ de vidro e entre duas camadas de sulfato de sódio anidro. Submeter a coluna à sucção de uma trompa de água, capaz de produzir uma vazão de 42 gotas/minuto. Lavar a coluna com 10 mL de clorofórmio. Evaporar o eluído em banho-maria e redissolver em 200  $\mu$ L de benzeno para posterior quantificação em CCD, seguindo o mesmo procedimento executado para a quantificação do extrato de milho (item 3.6.1.4.)

Para quantificação de ZEA, utilizar o extrato obtido como em 3.6.1.3. Revelar com cloreto de alumínio e aquecer a placa por 10 minutos a 110°C.

### 3.7. VERIFICAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DO SISTEMA ANALÍTICO DESENVOLVIDO

Após definição da metodologia, foram contaminadas amostras de cada um dos produtos (milho, feijão, soja, arroz e trigo) com cada uma das micotoxinas, em dois níveis diferentes, sendo um de 5 e o outro de 10 vezes o limite de detecção da micotoxina. Procedeu-se à execução do método proposto e determinou-se a porcentagem de recuperação.

### 3.8. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO

Amostras de milho, soja, trigo, feijão e arroz foram contaminadas com 2 vezes o limite de detecção de cada micotoxina. Foi realizada a extração e a limpeza descritos em 3.6.3.3. para trigo e 3.6.1.3 para os outros produtos. O extrato final foi redissolvido em 100  $\mu$ L de benzeno. Foram aplicadas na placa quantidades diferentes do extrato e determinada a menor quantidade em que ainda era possível visualizar a toxina em meio a matriz do alimento.

### 3.9. VERIFICAÇÃO DA REPETIBILIDADE DO SISTEMA ANALÍTICO DESENVOLVIDO, COM AMOSTRAS CONTAMINADAS POR INOCULAÇÃO DE CEPAS TOXIGÊNICAS DE FUSARIUM

As amostras foram preparadas com milho de pipoca e cepas de F.poae NRRL 3511 e F.sporotrichioides NRRL 3510.

Foram convenientemente autoclavadas a 121°C por 15 minutos,

1200g de milho de pipoca divididos igualmente em 6 erlenmeyers de 500 mL. Para cada espécie de Fusarium, foram separados 600g de milho.

Paralelamente, cepas de F. poae e de F. sporotrichioides foram inoculadas em PDA (Potatoe Dextrose Agar) e deixadas à temperatura ambiente por 10 dias para obtenção de inóculo suficiente para a contaminação das amostras de milho. Foi feita suspensão dos inóculos em água e estes foram distribuídos igualmente entre 3 erlenmeyers contendo cada um 200g de milho e 50 mL de água destilada estéril.

Assim contaminados, os frascos foram acondicionados a 5°C durante 30 dias, seguidos de 3 dias à temperatura ambiente e mais 8 dias a 5°C. Após esse tempo, as amostras foram autoclavadas (121°C, 15 minutos) secas em estufa a 100°C e trituradas em moinho até obter-se uma granulometria de 20 mesh, após o que uma das amostras foi submetida ao teste de repetibilidade ou seja 5 determinações da mesma amostra, pelo método proposto.

### 3.10. TESTE DE ADEQUAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO

Triplicatas da amostra de milho contaminado por inoculação de F. sporotrichioides NRRL 3510 (item 3.9), foram submetidas ao método proposto. O tempo de extração com metanol:KCl 4% (9:1) foi de 5 minutos para a primeira triplicata, 10 minutos para a segunda e 20 minutos para a terceira. A quantidade de micotoxina foi quantificada em cada caso.

### 3.11. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE CONFIRMAÇÃO

Foram avaliadas diferentes condições para as reações químicas de acetilação, hidrogenação, hidrólise, metilação e esterificação.

Acetilação: foram executadas em placa (1 gota de anidrido acético:piridina (1:1)) e em vidro (50  $\mu$ L do padrão, 200  $\mu$ L de anidrido acético, 200  $\mu$ L de piridina) à 65°C em BM por 2,5 horas e à temperatura ambiente por 20 horas.

Hidrogenação: foram executadas em vidro (50  $\mu$ L do padrão, 200  $\mu$ L de etanol e cristais de  $\text{NaBH}_4$ ) a 65°C em BM por 2,5 horas e à temperatura ambiente por 20 horas.

Hidrólise: foram executadas em vidro (50  $\mu$ L do padrão, 200  $\mu$ L de metanol e 200  $\mu$ L NaOH 0,3 N) à 65°C em BM por 2,5 horas e por 5 minutos, e à temperatura ambiente por 20 horas e por 15 minutos.

Metilação: foram executadas em vidro (50  $\mu$ L do padrão, 200  $\mu$ L de metanol e 200  $\mu$ L de HCl 2M) à 65°C em BM por 2,5 horas.

Esterificação: foram executadas em placa (1 gota de anidrido acético)

As concentrações dos padrões utilizados são as mesmas citadas no item 3.6.1.4.

### 3.12. SISTEMA DE CONFIRMAÇÃO PROPOSTO PARA TRICOTECENOS

Aplicar de 5 a 10  $\mu$ L do extrato positivo presuntivo (extrato que apresentou mancha com mesma cor e Rf ao do padrão quando da quantificação em 3.6.1.4) em 4 placas. Paralelamente, aplicar também o pa-

drão da ou das micotoxinas suspeitas. Desenvolver duas placas em acetato de etila:n-hexano (2:1) e duas em clorofórmio:metanol (97:3).

Revelar cada placa com um dos seguintes reveladores: p-anisaldeído, ácido cromotrópico, sulfato de céσιο e 2,4 dinitrofenil-hidrazina. Observar se as cores e Rf continuam persistindo com as dos padrões. Se persistirem, fazer a reação de acetilação.

Acetilação em placa, no caso de T2 e DAS: aplicar dois pontos de 10  $\mu$ L do extrato em estudo na placa e dois pontos de 10  $\mu$ L do padrão. Em um dos pontos do extrato e em um dos pontos do padrão, adicionar uma gota da mistura piridina:anidrido acético (1:1). Deixar evaporar e desenvolver a placa em tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (6:3:1). Revelar com ácido sulfúrico. Observar se as manchas de extrato e padrão apresentam o mesmo comportamento.

Acetilação em vidro, no caso de ROR A e VER A: transferir para um frasco pequeno, 100  $\mu$ L do extrato e 400  $\mu$ L da mistura piridina:anidrido acético (1:1). Em outro frasco, adicionar 50  $\mu$ L do padrão e 400  $\mu$ L da mesma mistura. Deixar à temperatura ambiente por 20 horas ou em banho-maria 65°C por 2,5 horas. Evaporar os reagentes. Redissolver os extratos em 100  $\mu$ L de benzeno. Aplicar na placa e desenvolver no mesmo sistema citado acima, para T2 e DAS, e revelar com ácido sulfúrico. Observar o comportamento das manchas do extrato e do padrão.

### 3.13. DESCRIÇÃO DA VERIFICAÇÃO DO SISTEMA DE CONFIRMAÇÃO.

Para verificação do sistema de confirmação foram utilizadas 4 cepas toxigênicas de *Fusarium* (*F. poae* NRRL 3511 (1982), *F. sporotrichioides* NRRL 3510 (1982), *F. tricinctum* NRRL 3510 (1988) e *F. tricinc-*

tum NRRL 3299 (1988)). Cada cepa foi inoculada em duas amostras de milho de acordo com o tratamento descrito em 3.9. Uma das amostras foi mantida a 5°C e a outra a 25°C, numa tentativa de obter diferentes tricotecenos em cada amostra ou nas diferentes amostras. As amostras foram analisadas pelo método descrito em 3.6.1.3 e confirmadas simultaneamente por espectrometria de massa e pelo sistema de confirmação aqui desenvolvido para tricotecenos, descrito em 3.12.

Para a análise em espectrometria de massa, as micotoxinas foram isoladas por cromatografia preparativa e analisadas no Instituto de Química da UNICAMP, em espectrofotômetro de massa Variant MAT 311 A, nas seguintes condições: temperatura do sistema de entrada: faixa de 100 a 110°C; temperatura da sonda: faixa de 100 a 275°C; corrente iônica total (TIC): faixa de 0,1 a 2,0 e energia dos elétrons: 70 V.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ESCOLHA DE REVELADORES

Dentre os reveladores testados, o ácido sulfúrico foi o que apresentou o melhor limite de detecção (tabela 17). Foi então o revelador escolhido para quantificação. Apresenta, além disso, outras vantagens tais como disponibilidade, estabilidade e baixo custo.

TABELA 17 : Limites de detecção das micotoxinas sob luz ultravioleta de ondas longas (ng)

Revelador	Micotoxinas				
	ZEA	DAS	T2	ROR A	VER A
1	24	---	---	---	---
2	24	50	40	40	50
3	36	350	340	160	304
4	72	700	306	790	---
5	24	700	340	1056	---
6	60	---	---	---	---
7	240	3150	2040	528	912

Reveladores: 1- Cloreto de alumínio, 2- Ácido sulfúrico, 3- Sulfato de céσιο, 4- 2,4 dinitrofenil-hidrazina, 5- p-Anisaldefido, 6- Fast violet B, 7- Ácido cromotrópico.

Nas tabelas 17 e 18 pode-se observar os limites de detecção encontrados, e nas tabelas 19 e 20, as diferentes cores resultantes dos diversos reveladores, cores estas que podem ser utilizadas como dados corroborativos na identificação dos tricotecenos e da zearaleno-na.

**TABELA 18:** Limites de detecção das micotoxinas sob luz visível (ng)

-----					
Micotoxinas					
-----					
Revelador	ZEA	DAS	T2	ROR A	VER A
-----					
1	---	---	---	---	---
2	24	350	272	198	304
3	40	583	---	330	380
4	72	1050	2040	1056	---
5	36	350	680	79	608
6	36	---	---	---	---
7	96	350	340	240	912
-----					

Reveladores: 1- Cloreto de alumínio, 2- Ácido sulfúrico, 3- Sulfato de céσιο, 4- 2,4 dinitrofenil-hidrazina, 5- p-Anisaldeído, 6- Fast violet B, 7- Ácido cromotrópico.



TABELA 19: Cores visualizadas sob luz ultravioleta de ondas longas

Micotoxinas

Revelador	ZEA	DAS	T2	ROR A	VER A
1	azul es- verdeado	---	---	---	---
2	amarelo	azul	azul es- verdeado	azul	azul
3	marrom claro	amarelo	amarelo	amarelo	amare- lo
4	amarelo	amarelo	amarelo	amarelo	---
5	marrom	violeta	azul	tijolo	---
6	violeta	---	---	---	---
7	amarelo	marrom	marrom	amarelo	amare- lo

Reveladores: 1- Cloreto de alumínio, 2- Ácido sulfúrico, 3- Sulfato de céσιο, 4- 2,4 dinitrofenil-hidrazina, 5- p-Anisaldeído, 6- Fast violet B, 7- Ácido cromotrópico.

TABELA 20: Cores visualizadas sob luz visível

Revelador	Micotoxinas				
	ZEA	DAS	T2	ROR A	VER A
1	---	---	---	---	---
2	marrom	cinza	cinza	marrom	marrom
3	marrom	marrom	---	marrom	marrom
4	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro	---
5	marrom	rosa choque	rosa claro	azul es- curo	rosa claro
6	violeta	---	---	---	---
7	ocre	violeta	violeta	ocre	ocre

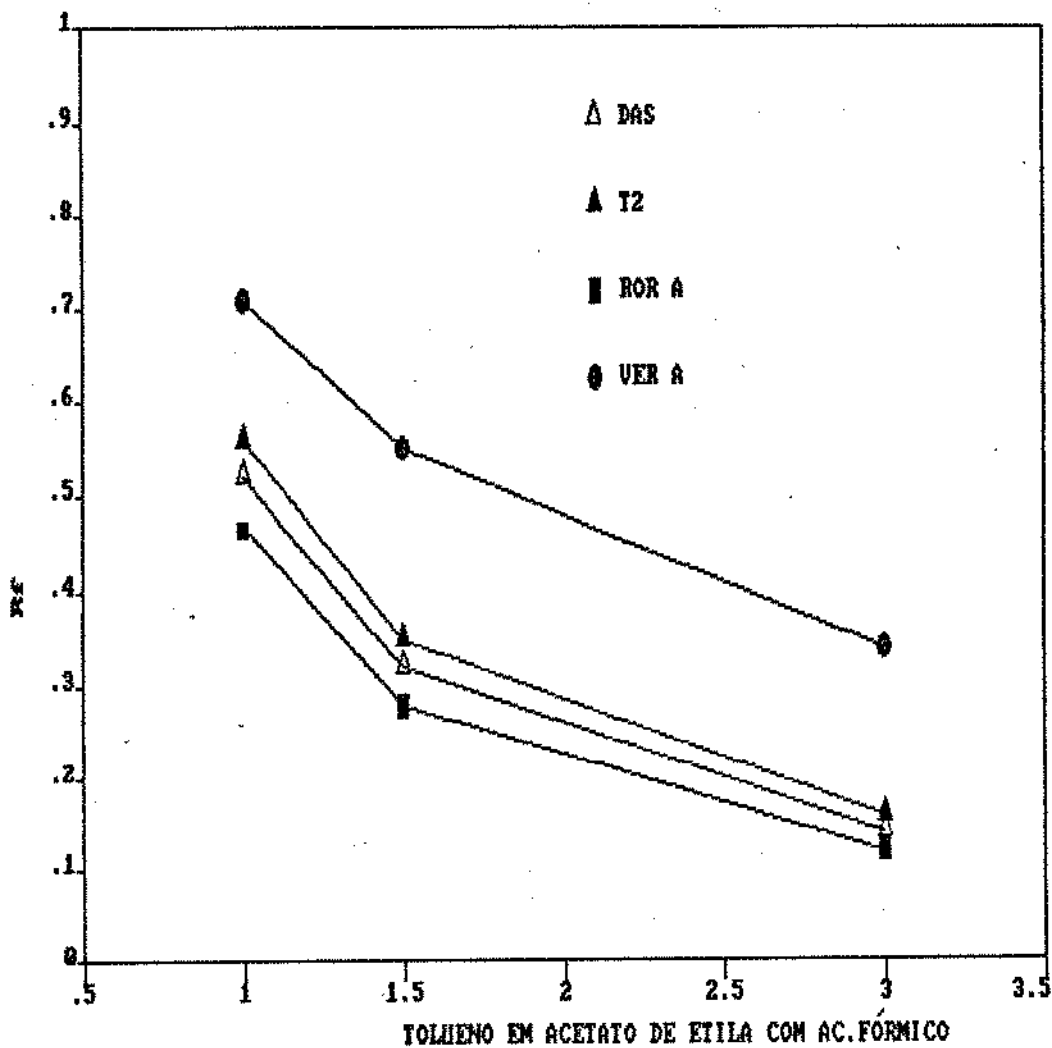
Reveladores: 1- Cloreto de alumínio, 2- Ácido sulfúrico, 3- Sulfato de céσιο, 4- 2,4 dinitrofenil-hidrazina, 5- p-Anisalaldeído, 6- Fast violet B, 7- Ácido cromotrópico.

#### 4.2. SISTEMAS SOLVENTES

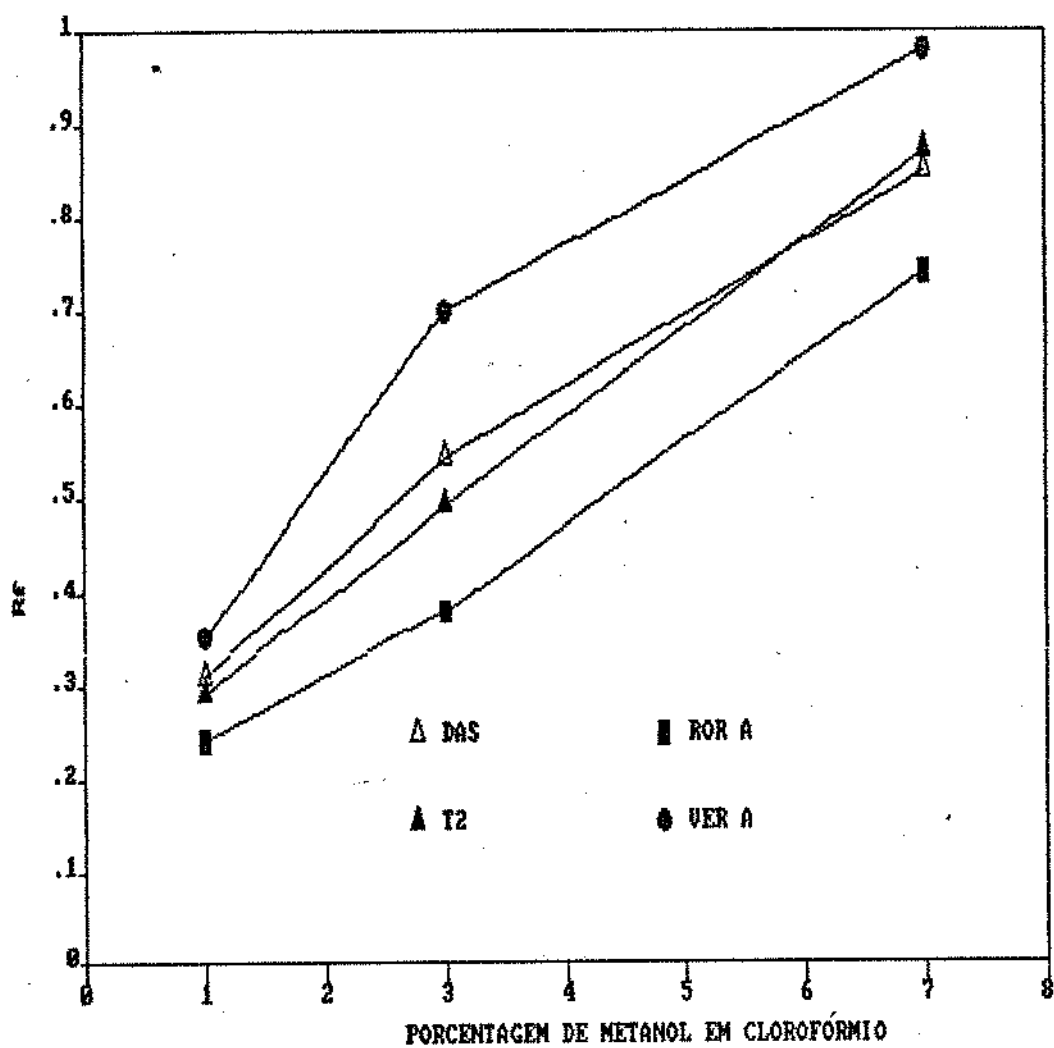
Na procura do sistema solvente mais apropriado, deparamos com a dificuldade em separar simultaneamente as cinco micotoxinas em estudo, como pode ser observado pelos valores de Rf constantes da tabela 21, assim como nos gráficos apresentados nas figuras 4, 5, 6 e 7. Esta

TABELA 21: Sistemas solventes e Rf encontrados para as micotoxinas

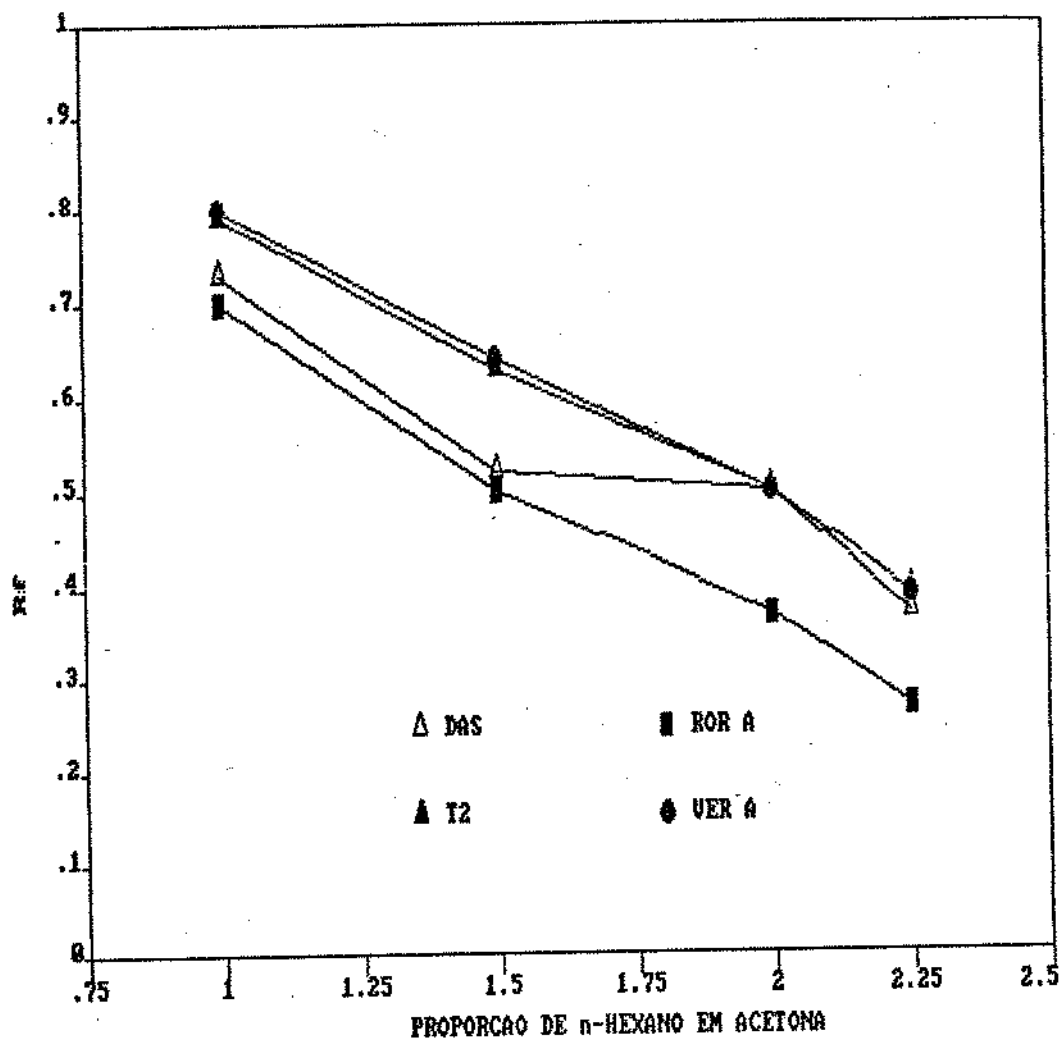
SISTEMAS SOLVENTES	ZEA	DAS	T-2	ROR-A	VER-A
01. Clorofórmio:metanol (93:7)	0.84	0.85	0.87	0.74	0.98
02. Clorofórmio:metanol (97:3)	0.46	0.54	0.49	0.38	0.70
03. Clorofórmio:metanol (99:1)	0.33	0.31	0.29	0.24	0.35
04. Clorofórmio:etanol (5:95)	0.94	0.95	0.94	0.95	0.94
05. Clorofórmio:éter de petróleo (3:1)	0.12	0.10	0.09	0.11	0.06
06. Clorofórmio:acetona:n hexano (7:2:1)	0.98	0.96	0.93	0.66	0.98
07. Clorofórmio:acetona:2 propanol (85:10:5)	0.93	0.72	0.72	0.61	0.86
08. Clorofórmio:metanol:ácido acético (91:8:1)	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
09. Benzeno:acetona (1:1)	0.97	0.83	0.87	0.81	0.94
10. Benzeno:acetona (2:1)	0.88	0.67	0.69	0.62	0.77
11. Acetona:n hexano (2:3)	0.71	0.52	0.62	0.50	0.64
12. Acetona:n hexano (1:2)	0.65	0.50	0.50	0.37	0.50
13. Acetona:n hexano (2:5)	0.52	0.37	0.39	0.27	0.39
14. Acetona:n hexano (1:1)	0.89	0.73	0.79	0.70	0.80
15. Acetato de etila:n hexano (2:1)	0.86	0.40	0.39	0.30	0.62
16. Acetato de etila:n hexano (5:1)	0.93	0.65	0.70	0.60	0.82
17. Tolueno:acetato de etila (1:3)	0.86	0.84	0.85	0.85	0.86
18. Tolueno:acetato de etila:acetona (3:2:1)	0.85	0.57	0.60	0.54	0.75
19. Tolueno:acetato de etila:acetona (2:3:1)	1.00	0.84	0.86	0.82	0.94
20. Tolueno:acetato de etila:acetona (4:2:1)	0.80	0.50	0.48	0.46	0.69
21. Tolueno:acetato de etila:acetona (2:2:1)	0.90	0.68	0.71	0.65	0.82
22. Tolueno:acetona:metanol (5:3:2)	0.91	0.82	0.85	0.82	0.89
23. Acetona:acetato de etila:etanol (4:4:1)	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99
24. n Hexano:tetracloreto de carbono: acetato de etila (2:10:1)	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
25. Tolueno:acetato de etila:clorofórmio ácido fórmico 86% (100:50:50:0,5)	0.65	0.19	0.19	0.14	0.35
26. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (6:3:1)	0.83	0.38	0.42	0.42	0.55
27. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (60:40:0,5)	0.81	0.32	0.35	0.28	0.55
28. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (10:9:1)	0.88	0.51	0.59	0.63	0.76
29. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (50:50:2,5)	0.93	0.59	0.65	0.58	0.81
30. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (50:50:0,5)	0.92	0.51	0.56	0.47	0.71
31. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (75:25:0,5)	0.67	0.14	0.16	0.12	0.34



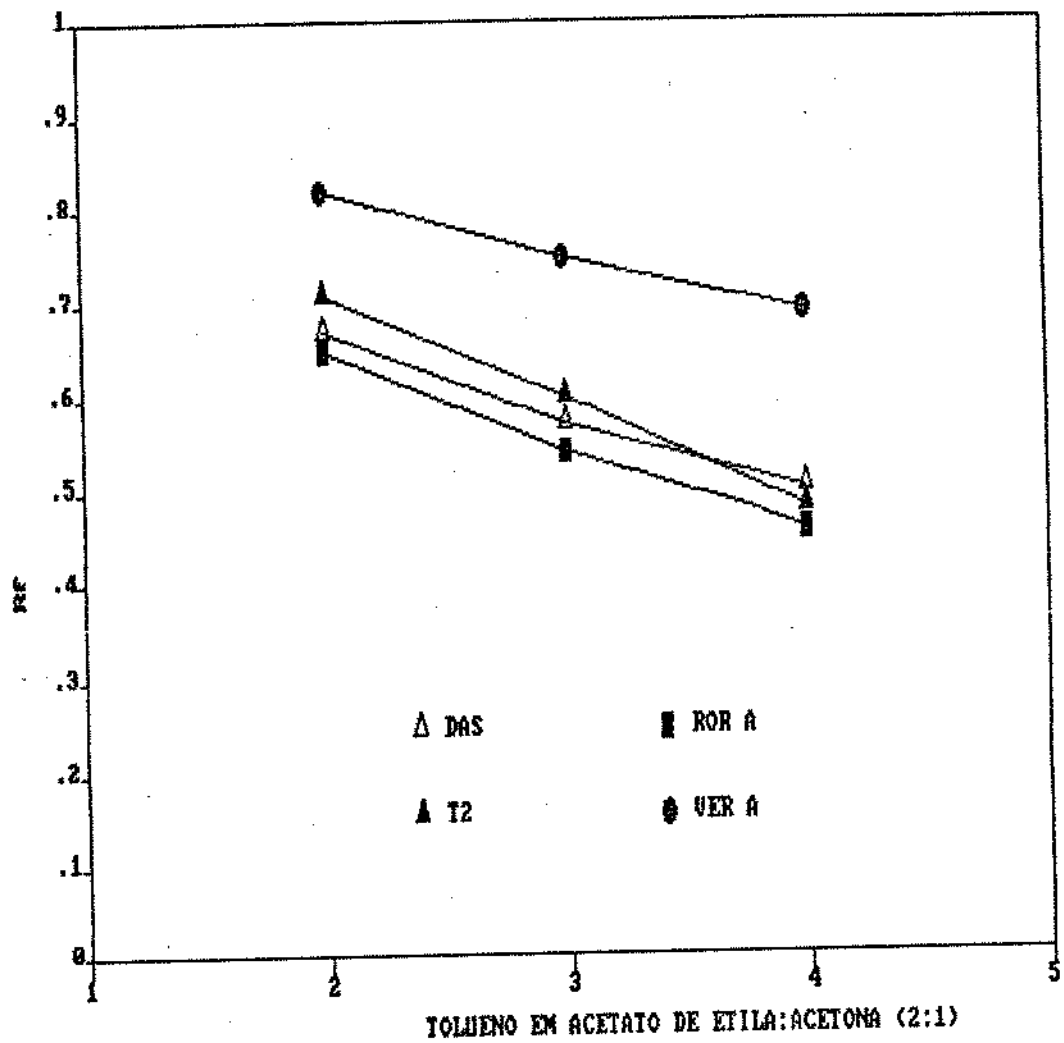
**FIGURA 3:** Comportamento de alguns tricótecos diante da variação na proporção de tolueno em acetato de etila, na mistura tolueno:acetato de etila (v/v) contendo 0,5% de ácido fórmico



**FIGURA 4:** Comportamento de alguns tricótecos diante da variação na porcentagem de metanol na mistura metanol/clorofórmio (v/v)



**FIGURA 5:** Comportamento de alguns tricotecenos diante da variação na proporção de n-hexano em acetona (v/v)



**FIGURA 6:** Comportamento de alguns tricótecos diante da variação na proporção de tolueno na mistura acetato de etila:acetona (2:1) (v/v)

dificuldade era esperada, visto a grande semelhança estrutural apresentada pelos compostos desta família.

Nos gráficos, observa-se o comportamento das micotoxinas diante de alguns sistemas que se apresentaram mais promissores. Tornaram-se, portanto, objeto de maior investigação, variando-se as proporções entre os solventes constituintes dos sistemas em estudo.

Um dos sistemas que se apresentou mais apropriado foi o tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (6:3:1). Apresentou uma melhor separação entre DAS, T2, VER A e ZEA, embora T2 e ROR A praticamente se superponham. Para a separação de ROR A e T2, o sistema acetato de etila:n-hexano (2:1) mostrou-se o indicado.

Os dados de Rf referentes aos diversos sistemas testados podem também servir como dados corroborativos na identificação, além de sua utilidade em eliminar falsos positivos presuntivos.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DO MÉTODO SOARES-AMAYA

O método Soares-Amaya foi desenvolvido originalmente para determinação de aflatoxinas, ocratoxina, esterigmatocistina e zearaleno-na (118). Diante dos atrativos apresentados por este método, ou seja, repetibilidade e exatidão adequados, baixo custo, simplicidade e rapidez de execução, decidiu-se verificar a possibilidade de estendê-lo de maneira a englobar também tricotecenos. Tal abordagem permitiria o emprego de uma extração e uma única etapa de limpeza para a determinação de um número maior de micotoxinas.

Além dos aspectos discutidos acima, outras facetas são de in-



teresse para laboratórios nacionais. Uma delas é o uso do metanol na extração das amostras. O metanol é pouco eficiente na extração de lípidos implicando em extratos mais limpos que não vão necessitar de uma etapa adicional de desengorduramento. Trata-se também de um solvente de volatilidade e toxidez baixas. O outro aspecto digno de nota vem a ser a utilização de clarificantes na limpeza do extrato, em vez de procedimentos elaborados de cromatografia. Finalmente, os clarificantes utilizados, sulfato de cobre e sulfato de amônia, são de baixo custo e facilmente disponíveis.

O método SOARES-AMAYA não se mostrou adequado para determinação de tricotecenos pois apresentou um extrato com muitos interferentes quando a placa foi revelada com ácido sulfúrico.

As características desejadas no extrato, para que este seja considerado límpido, são: a ausência, após revelação com ácido sulfúrico, de "streaking" (faixa de impurezas que mancha a placa do ponto de aplicação da amostra até a frente do solvente) e de manchas adicionais, com  $R_f$  igual ou diferente das micotoxinas, pois estes fatores podem prejudicar ou mesmo inviabilizar a identificação destas.

#### 4.4. METODOLOGIA ANALÍTICA DESENVOLVIDA

##### 4.4.1. MILHO

O presente trabalho abordou, numa primeira etapa, o desenvolvimento de um método que fosse adequado à análise de milho. Este cereal, além de ter grande consumo a nível nacional, contém um teor elevado de pigmentos que são co-extraídos com as micotoxinas. A eliminação eficiente de interferentes vem a ser uma etapa crucial em qualquer método de determinação de substâncias presentes a nível de  $\mu\text{g/kg}$  ou  $\text{mg/kg}$ . Considerou-se que um procedimento que viesse a se mostrar apropriado para milho teria boas chances de obter sucesso com outros alimentos.

Paralelamente, colocou-se como objetivo a utilização de etapas simples e rápidas. Fator este importante, por um lado, para que o método tenha emprego nas mais diversas condições laboratoriais dentro do território nacional. Por outro lado, sistemas de limpeza que compreendam várias etapas ou que apresentem uma maior complexidade, implicam forçosamente numa recuperação mais baixa e no aumento do tempo gasto com a análise.

Para a extração, manteve-se o solvente metanol:KCl 4% (9:1), pelas razões discutidas em 4.3. Inicialmente, uma etapa de limpeza por adsorção foi testada como uma complementação à clarificação com sulfato de amônia, ao desengorduramento com n-hexano e à partição para clorofórmio. Os adsorventes utilizados estão descritos na tabela 14.

O tratamento com n-hexano, uma partição, tem sido tradicionalmente chamado de desengorduramento. Tal termo foi mantido, principalmente para diferenciar da partição para o clorofórmio. Sua função, neste caso, é bem mais a retirada de pigmentos e outros co-extrativos com afinidade por solventes não polares, do que a retirada de lipídios. Como foi discutido em 4.3., o metanol é pouco eficiente na extração de lipídios da amostra.

Nenhum dos adsorventes resultou satisfatório. Apenas pôde ser observado que a minicoluna preparada com Hyflosupercel:MgO (4:1) ativado a 100°C por 2 horas e tendo como eluente o clorofórmio, apresentou "streaking" mais fraco que as demais minicolunas.

Diante da inadequação do sistema de limpeza utilizado no método Soares-Amaya, tornou-se necessária a avaliação de outros clarificantes, em substituição ao sulfato de amônia. Idealmente, este clarificante permitiria prescindir de uma etapa adicional de limpeza por adsorção empregando colunas ou minicolunas.

Dentre os clarificantes avaliados (tabela 22), o gel férrico com carbonato de cobre básico mostrou-se o mais apropriado visto que apresentou um extrato límpido e dentro dos requisitos para identificação e quantificação em camada delgada.

Ficaram então definidos os sistemas de extração e limpeza esquematizados na figura 7.

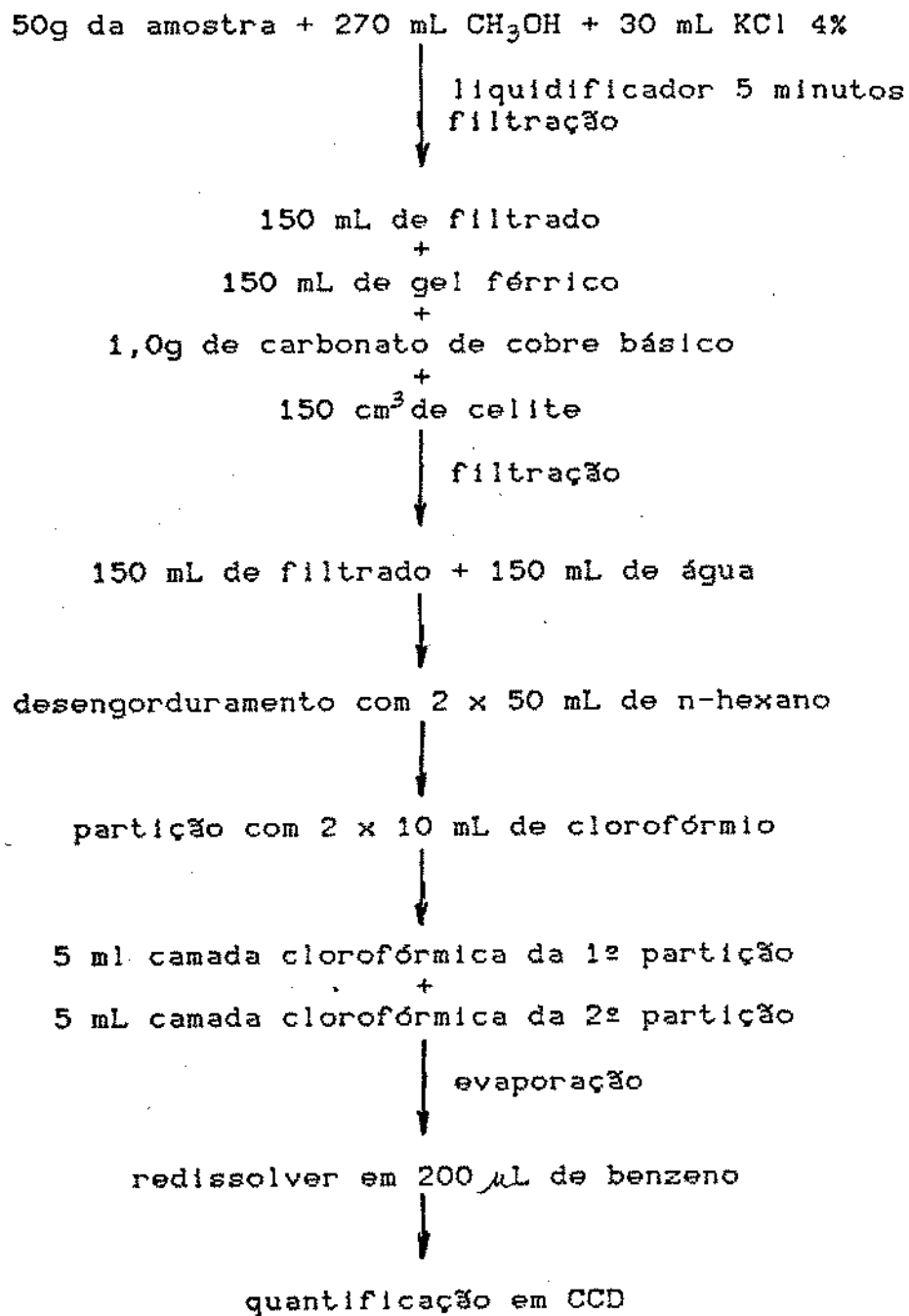
TABELA 22: Avaliação de clarificantes\*

Clarificante	Clarificante adicional **	Interferentes ***
Sulfato de amônia	-----	++++
Ferrocianeto de potássio/ acetato de zinco	-----	++++
Acetato de chumbo	-----	++
Acetato de zinco	-----	+++
Sulfato de zinco	-----	+++
Gel férrico/carbonato de cobre básico	-----	+
Sulfato de amônia	Carbonato de cobre básico	++++
Sulfato de amônia	Sulfato de cobre	++++
Sulfato de amônia	Cloreto férrico	++++
Sulfato de amônia	Sulfato de cálcio	++++

\* Esta avaliação foi feita após extração do milho com metanol:KCl 4% (9:1), e o filtrado da clarificação foi então submetido a um desengorduramento com n-hexano e partição para clorofórmio o qual, em algumas tentativas, foi submetido a um clarificante adicional.

\*\* : O clarificante adicional foi utilizado para limpeza do extrato clorofórmico

\*\*\* : O número de cruzeiros indica a intensidade do "streaking"



**FIGURA 7:** Metodologia desenvolvida para milho

#### 4.4.2. FEIJÃO, ARROZ E SOJA

A metodologia desenvolvida para o milho foi avaliada também para estes grãos. Uma comparação foi realizada com minicolunas de Hyflosupercel:MgO (4:1) ativado 100°C, 2 horas (tabela 15), partindo-se de um extrato clarificado com sulfato de amônia e que apresentou emulsão quando foi submetido à partição com clorofórmio (emulsão esta que foi quebrada com auxílio de um bastão de vidro). A revelação foi realizada com ácido sulfúrico. Estes extratos não se mostraram tão límpidos quanto os provenientes do tratamento com gel férrico, permanecendo o método desenvolvido para o milho como o mais indicado também para estes produtos.

#### 4.4.3. TRIGO

O método desenvolvido para milho, quando aplicado ao trigo, revelou grande quantidade de interferentes no extrato visualizado com ácido sulfúrico. Foram então realizados novos testes, utilizando-se os clarificantes descritos na tabela 23.

Os clarificantes ferrocianeto de potássio em combinação com acetato de zinco, a mistura de sulfato de zinco e ácido fosfotúngstico, e o sulfato de cálcio 10%, formaram emulsão na camada clorofórmica, na etapa de partição, impossibilitando a continuidade da análise.

TABELA 23: Clarificantes testados para o trigo\*

Clarificante	Interferentes **
Gel férrico/carbonato de cobre básico	++
Sulfato de amônia	++++
Sulfato de cobre	++++
Ferrocianeto de potássio/acetato de zinco	---
Acetato de chumbo	+++
Acetato de zinco	++++
Sulfato de zinco	---
Sulfato de cálcio	---

\*= O trigo foi extraído com metanol:KCl 4% (9:1), submetido ao clarificante e posterior desengorduramento em n-hexano e partição para clorofórmio.

\*\*= O número de cruzeiros indica a intensidade do "streaking"

---= emulsão

Os clarificantes acetato de chumbo e gel férrico, em combinação com carbonato de cobre básico, produziram os melhores resultados, porém ainda não aceitáveis. A clarificação com gel férrico/carbonato de cobre básico foi então examinada em conjunto com os adsorventes acondicionados em minicolunas, descritos na tabela 16. Na ausência de resultados adequados, uma nova minicoluna, preconizada por Trucksess *et al.* (147) para DON, foi testada com bons resultados. Assim sendo, obteve-se um extrato límpido para trigo com as seguintes etapas: (a)

clarificação com gel férrico/carbonato de cobre básico, (b) desengorduramento com n-hexano, (c) partição para clorofórmio, (d) adsorção em coluna de carvão:celite:alumina (0,7:0,3:0,5). O procedimento final está esquematizado na figura 8.

A determinação de zearalenona é realizada no extrato clorofórmico sem a utilização da coluna de limpeza. Este procedimento foi adotado como alternativa, visto que a coluna de carvão:celite:alumina utilizada, adsorve a zearalenona, logo esta não poderia ser determinada junto com os tricotecenos no caso do trigo. A revelação é realizada com cloreto de alumínio.

#### 4.4.4. RECUPERAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

Foi determinada a recuperação e o coeficiente de variação dos métodos desenvolvidos, utilizando-se amostras de milho, feijão, arroz, soja e trigo artificialmente contaminadas em dois níveis para cada micotoxina (5 e 10 vezes o limite de detecção). As determinações foram realizadas em triplicata para cada nível. A recuperação média e o coeficiente de variação encontrados foram de 101% e 16% , respectivamente (tabela 24).



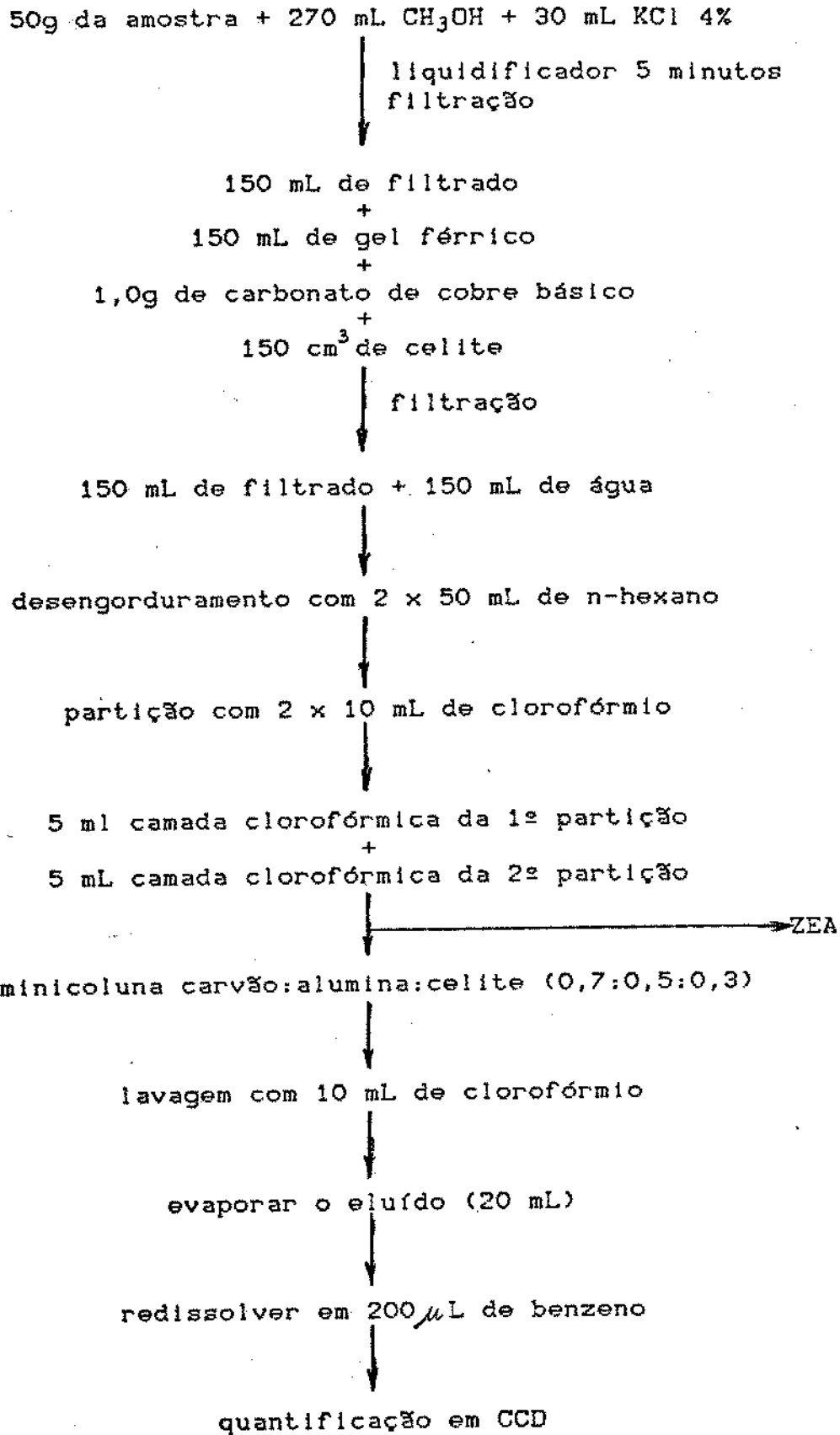


FIGURA 8: Metodologia desenvolvida para trigo

TABELA 24: Valores da recuperação dos métodos desenvolvidos (%)

Produto	Micotoxina	5 X L. detecção			10 X L. detecção		
		Quant.ad.* ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	média **	C.V.	Quant.ad.* ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	média **	C.V.
Milho	ZEA	320	93	0	640	92	5
	DAS	1867	124	0	3734	124	0
	T2	1360	124	0	2720	114	5
	ROR A	1584	107	6	2987	102	15
	VER A	1824	93	0	3040	95	15
Feijão	ZEA	320	81	10	640	83	17
	DAS	1867	83	0	3734	124	0
	T2	1360	81	10	2720	83	0
	ROR A	1584	104	0	2987	113	0
	VER A	1824	94	2	3040	94	17
Arroz	ZEA	320	93	0	640	97	19
	DAS	1867	83	0	3734	122	4
	T2	1360	81	10	2720	107	6
	ROR A	1584	104	0	2987	113	0
	VER A	1824	93	0	3040	67	9
Soja	ZEA	320	99	11	640	72	14
	DAS	1867	104	20	3734	116	14
	T2	1360	116	7	2720	103	6
	ROR A	1584	72	18	2987	104	16
	VER A	1824	103	18	3040	73	9
Trigo	ZEA	320	87	10	640	98	9
	DAS	1867	125	13	3734	116	0
	T2	1360	124	0	2720	114	18
	ROR A	1584	109	18	2987	120	7
	VER A	1824	119	9	3040	124	0

\* Quant.ad. = Quantidade adicionada

\*\* : média de três determinações

#### 4.4.5. LIMITE DE DETECÇÃO DOS MÉTODOS

Este limite difere do limite de detecção da micotoxina pura (tabela 17), devido à inevitável presença de co-extrativos que impedem a visualização na placa, das toxinas presentes em extratos de amostras no mesmo nível que em soluções puras de padrões.

TABELA 25: Limite de detecção dos métodos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Micotoxina	Milho	Feijão	Arroz	Soja	Trigo
ZEA	154	154	154	154	154
DAS	1500	900	900	900	900
T2	1100	650	650	650	650
ROR A	790	790	790	790	790
VER A	900	900	1500	1500	900

#### 4.4.6. REPETIBILIDADE

Os valores encontrados no teste de repetibilidade (tabela 26), aqui executado em amostra de milho contaminado por inoculação com F. sporotrichioides, demonstram que repetições do método proposto, utilizando uma mesma amostra e no mesmo laboratório, dão origem a um coeficiente de variação na faixa aceita internacionalmente para resultados intralaboratoriais quando a cromatografia em camada delgada é utilizada ( $\leq 20\%$ ).

**TABELA 26:** Valores encontrados em 5 determinações de uma mesma amostra contaminada por inoculação com F. sporotrichioides.

Determinação	mg/kg de T2
1	4,2
2	4,2
3	3,4
4	3,4
5	3,4
média	3,7
C.V. (%)	11,8

#### 4.4.7. ADEQUAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO

Os valores encontrados na adequação do tempo de extração estão na tabela 27 e demonstram que o tempo de contato entre o material e o solvente, de 5 minutos, é suficiente para extração máxima das micotoxinas contidas em amostras naturalmente contaminadas.

TABELA 27: Valores encontrados no tempo de adequação de extração

Tempo	mg/kg de T2
5 minutos	3,4
10 minutos	3,4
20 minutos	3,4

#### 4.5. CONFIRMAÇÃO

O fato dos tricotecenos constituírem uma família com mais de 60 compostos de composição química muito semelhante torna sua identificação especialmente elaborada. No caso de outras micotoxinas, uma reação química de derivação é considerada suficiente para uma identificação conclusiva. Já com os tricotecenos, considerou-se prudente no presente trabalho a adoção de uma postura mais conservadora. Além dos resultados de uma reação de derivação, foram utilizados dados corroborativos tais como Rf em três sistemas solventes diferentes e cores de-

envolvidas com 5 reveladores. Tal opção justifica-se pela semelhança química, já referida, entre os tricotecenos, o que abre a possibilidade da existência, dentre estes compostos, de alguns que possam apresentar o mesmo Rf antes da derivação (Rfa) e o mesmo Rf após a derivação (Rfb, sendo que  $Rfa \neq Rfb$ ). Um número maior de etapas confirmatórias oferecerá, portanto, um maior grau de segurança. Este cuidado pode, no futuro, provar desnecessário, caso dados provenientes de levantamentos demonstrem a ocorrência natural de apenas uns poucos tricotecenos. Com o grau de conhecimento atual, devemos assumir que um resultado positivo na reação de derivação comprova unicamente que estamos lidando com um tricoteceno. Evidentemente, o leque de possibilidades será forçosamente pequeno e definido pelo comportamento observado. A identificação final dependerá então dos Rf encontrados nos diversos sistemas solventes e das cores exibidas após tratamento com os reveladores.

Com a finalidade de encontrar reações de derivação apropriadas para os tricotecenos e a zearalenona, os reagentes e reações citados em literatura foram examinados (acetilação, hidrogenação, hidrólise, metilação e esterificação). No presente trabalho, foram estabelecidas condições que permitissem sua utilização na confirmação destas micotoxinas (Tabela 28).

A reação de acetilação executada na placa, e aqui proposta, é extremamente rápida e simples e pode ser empregada para toxina T2 e DAS. No caso de ZEA, este procedimento já foi relatado por Golinski e Grabarkiewicz-Szczesna (38) para esta micotoxina e aqui apenas comprovamos a sua eficácia. A referida reação executada em vidro (banho-maria 65°C por 2,5 horas ou à temperatura ambiente por 20 horas), mos-

trou-se eficiente para todas as micotoxinas em estudo e é a indicada para ROR A e VER A.

**TABELA 28:** Resultados observados das reações químicas avaliadas

Reação	ZEA	DAS	T-2	ROR A	VER A
Acetilação em placa	↑	↑	↑	-	-
Acetilação em vidro, 65°C BM, 2,5h	↑	↑	↑	↑	↑
Acetilação em vidro, TA, 20h	↑	↑	↑	↑	↑
Hidrogenação em vidro, 65°C BM, 2,5h	ND	ND	ND	ND	ND
Hidrogenação em vidro, TA, 20h	ND	ND	ND	ND	ND
Hidrólise em vidro, 65°C BM, 2,5h	ND	ND	ND	ND	ND
Hidrólise em vidro, 65°C BM, 5min.	ND	ND	ND	↓	↓
Hidrólise em vidro, TA, 20 h	ND	ND	ND	ND	ND
Hidrólise em vidro, TA, 15min.	ND	ND	ND	↓	↓
Metilação em vidro, 65°C BM, 2,5h	ND	ND	ND	ND	ND
Esterificação em placa	-	-	-	-	-

↑: Rf após a derivação era maior que o Rf do padrão antes de reagir

↓: Rf após a derivação era menor que o Rf do padrão antes de reagir

-: Rf após a derivação era igual ao Rf antes da reação

ND: Após a reação, não era detectada nenhuma mancha na placa, nem a referente ao padrão inicial.

As micotoxinas submetidas às reações de hidrogenação e metilação não apresentaram derivados após a reação.

A reação de esterificação em placa, utilizada também para confirmação de ZEA (38), produziu resultados negativos para todas as micotoxinas testadas.

Foram avaliadas diferentes condições para a reação de hidrólise, sendo que a reação em vidro, à temperatura ambiente por 15 minutos ou em banho-maria a 65°C por 5 minutos, também mostrou-se indicada para ROR A e VER A.

Analisando as tabelas 19 e 20 (cores obtidas com os reveladores) e a tabela 21 (Rf com diferentes solventes), foi possível definir o seguinte esquema para identificação e confirmação de tricotecenos:

- Desenvolvimento em:

1. Tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 86% (6:3:1)
2. Acetato de etila:n-hexano (2:1)
3. Clorofórmio:metanol (97:3)

- Revelação com:

1. p-Anisalaldeído
2. Ácido cromotrópico
3. Sulfato de célio
4. 2,4 Dinitrofenil-hidrazina
5. Ácido sulfúrico

- Derivação com anidrido acético e piridina na própria placa para toxina T2 e DAS e em vidro com posterior aplicação na placa para ROR A e VER A.

Para zearalenona, a confirmação pode ser executada por derivação com anidrido acético e piridina na própria placa, como descrito por Golinski e Grabarkiewicz-Szczesna (38), e como dado corroborativo utilizar a revelação com cloreto de alumínio.



#### 4.6. VERIFICAÇÃO DO SISTEMA DE CONFIRMAÇÃO

Para verificar o sistema de confirmação, duas temperaturas foram empregadas na incubação das cepas de *Fusarium*, na tentativa de se obter mais de um tipo de tricoteceno. No entanto, só T2 foi produzida pelas cepas investigadas, com exceção do *F. tricinctum* NRRL 3510, que produziu a 5°C, também DAS, porém em quantidade muito inferior à de T2, o que impossibilitou a separação deste tricoteceno para posterior análise em espectrometria de massa.

Na tabela 29, são apresentadas as micotoxinas produzidas pelas diferentes cepas de *Fusarium*, assim como suas concentrações nas respectivas temperaturas de incubação.

Na figura 9 são apresentados os espectros obtidos com o padrão de T2 e com uma das amostras inoculadas, no caso T2 produzido por *F. poae* a 5°C.

A identificação por espectrometria de massa foi realizada comparando as razões entre alturas de picos de massa alta no espectro do composto suspeito e as mesmas razões no espectro do padrão.

TABELA 29: Toxinas produzidas por diferentes cepas de Fusarium

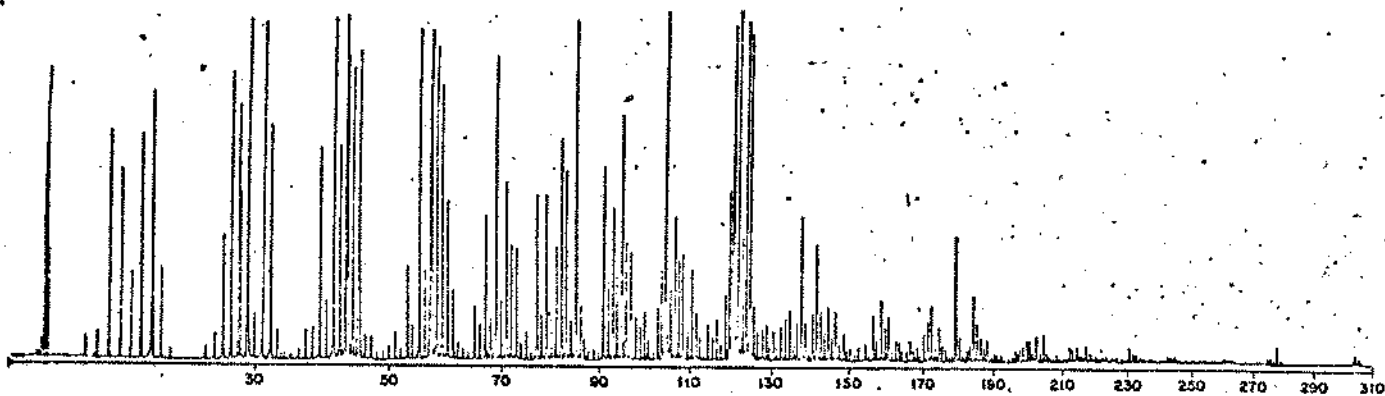
Cepa de <u>Fusarium</u> empregada	Temperatura de incubação (°C)	Toxina*	Concent. (mg/kg)	Toxina**
<u>F. poae</u> NRRL 3511 (1982)	5	T2	118,0	T2
	25	T2	3,0	T2
<u>F. sporotrichioides</u> NRRL 3510 (1982)	5	T2	3,7	I
	25	--	-----	---
<u>F. tricinctum</u> NRRL 3510 (1988)	5	T2	101,5	T2
		DAS	2,9	I
	25	--	-----	---
<u>F. tricinctum</u> NRRL 3299 (1988)	5	--	-----	---
	25	--	-----	---

\* Toxina confirmada pelo método proposto

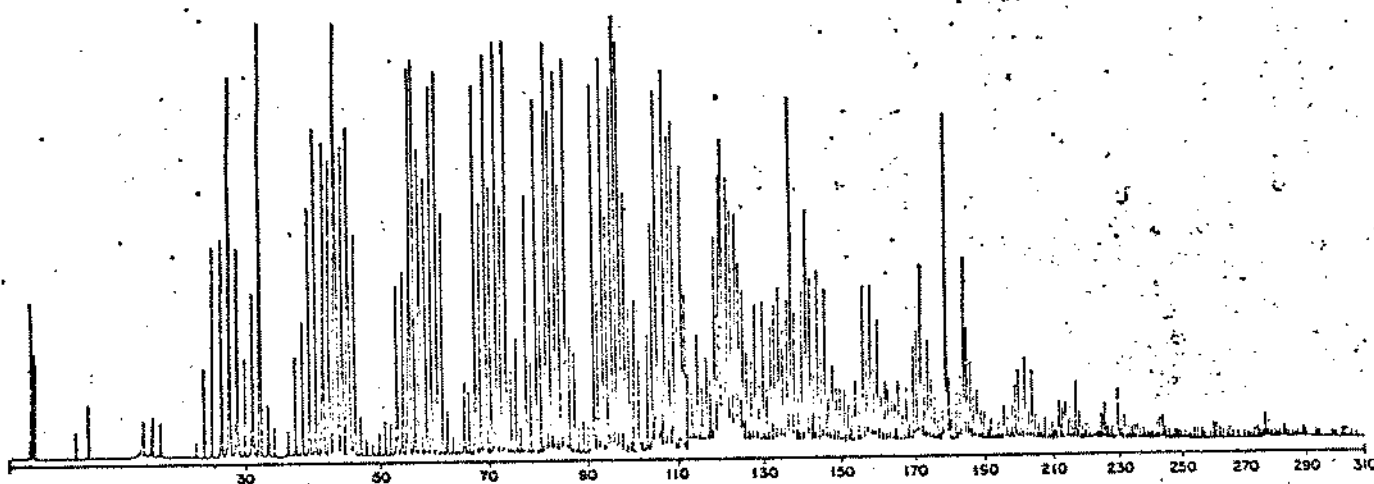
\*\* Toxina confirmada por espectrometria de massa

I: Quantidade isolada insuficiente para aplicação no espectrômetro de massa.

Os resultados sugerem um bom grau de confiabilidade no sistema de confirmação proposto. É recomendável que a comprovação por espectrometria de massa seja seguida em paralelo por pelo menos um laboratório no país por algum tempo. Dessa maneira, total segurança no sistema de confirmação por CCD será atingida e talvez até simplificações sejam indicadas pelos resultados. Para laboratórios sem acesso a espectrometria de massa, o sistema pode ser empregado com boa margem de segurança.



Espectro de T2 padrão



Espectro de T2 isolado de *F. poae*, a 5°C

FIGURA 9: Espectros de T2 em espectrometria de massa

## CONCLUSÕES

1. Uma metodologia foi desenvolvida para determinação de toxina T2, diacetoxiscirpenol, roridina A, verrucarina A e zearalenona em milho, feijão, soja e arroz que apresenta características que a tornam desejável para emprego em laboratórios nacionais e em outros pertencentes a países em desenvolvimento. Tais características são: simplicidade de execução, baixo custo, rapidez e utilização de equipamento de uso comum e facilmente disponível. A referida metodologia provou possuir exatidão e repetibilidade adequadas (recuperação média de 101% e coeficientes de variação de 16% e 12% com amostras artificialmente contaminadas e amostras contaminadas por inoculação com cepa toxigênica de *Fusarium*, respectivamente). Seus limites de detecção mostram-se apropriados para trabalhos com amostras com teores médios e altos de contaminação (zearalenona - 154  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; diacetoxiscirpenol - 900 a 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; toxina T2 - 650 a 1100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; roridina A - 790  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; verrucarina A - 900 a 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

2. Com adição de uma etapa envolvendo uma minicoluna, o mesmo procedimento pode ser empregado na determinação de toxina T2, diacetoxiscirpenol, verrucarina A e roridina A em trigo.

3. Uma reação de derivação (acetilação) para toxina T2 e diacetoxiscirpenol, realizada diretamente na placa, foi desenvolvida. Para roridina A e verrucarina A, condições para uma reação de acetilação em vidro, foram determinadas.

4. Uma sistemática incluindo o desenvolvimento em três sistemas solventes, cinco reveladores e uma reação de acetilação, para confirmação de toxina T2, diacetoxiscirpenol, verrucarina A e roridina A

em camada delgada é proposta. Tal sistema possibilitará um maior grau de segurança na identificação destes compostos em laboratórios sem acesso a espectrometria de massa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. Anon, in "Global perspective on mycotoxins", MYC 4a (Proc. Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization - United Nations Environment Programme Conf. on Mycotoxins, Nairobi, Kenya, September 19-27, 1977): pp 39-42, 54 (1977). Citado em BENNETT, G.A. & SHOTWELL, O.L. Zearalenone in cereal grains. J. Am. Oil Chem. Soc. 56(9):812-819, 1979.
002. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. "Official methods of analysis" 14<sup>th</sup> ed. Arlington, Virginia, Item 26113, 1984.
003. BAMBURG, J.R. - The biological activities and detection of naturally occurring 12,13 epoxy trichothecenes. Clinical Toxicology. 5(4):495-515, 1972.
004. BAMBURG, J. R.; MARASAS, W.F.; RIGGS, N.V.; SMALLEY, E.B.; STRONG, F.M. - Toxic spiroepoxy compounds from Fusaria and other Hyphomycetes. Biotechn. and Bioeng. 10:445-455, 1968.
005. BAMBURG, J.R.; STRONG, F.M. - Mycotoxins of the trichothecane family produced by Fusarium tricinctum and Trichoderma lignorum. Phytochemistry 8:2405-2410, 1969.
006. BATA, A.; LASZTITY, R.; BALLA, J. - Contribution to the determination of Fusarium toxins. Acta Alimentaria 9(2):99-106, 1980.
007. BATA, A.; VANYI, A.; LASZTITY, R. - Rapid analytical method for the quantitative determination of trichothecene toxins in food and feeds. Acta Veterinaria Hungarica 32(1-2):51-56, 1984.

008. BATA, A.; VANYI, A.; LASZTITY, R. - Simultaneous detection of some fusariotoxins by gas-liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66(3):577-580, 1983.
009. BATA, A.; VANYI, A.; LASZTITY, R.; GALACZ, J. - Determination of trichothecene toxins in foods and feeds. J. of Chrom. 286: 357-362, 1984.
010. BAXTER, J.A., TERHUNE, S.J.; QURESHI, S.A. - Use of chromotropic acid for improved thin-layer chromatographic visualization of trichothecene mycotoxins. J. of Chrom. 261:130-133, 1983.
011. BECKWITH, A.C.; STOLOFF, L. - Fluorodensitometric measurement of aflatoxin thin layer chromatograms. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51(3):602-608, 1968.
012. BENNETT, G.A.; MEGALLA, S.E.; SHOTWELL, O.L. - Method of analysis for deoxynivalenol and zearalenone from cereal grains. J. Am. Oil Chem. Soc. 61(9):1449-1451, 1984.
013. BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L. - Zearalenone in cereal grains. J. Am. Oil Chem. Soc. 56(9):812-819, 1979.
014. BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L.; KWOLEK, W.F. - Liquid chromatographic determination of zearalenol and zearalenone in corn: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(5):958-961, 1985.
015. BHAVANISHANKAR, T.N.; SHANTHA, T. - Natural occurrence of Fusarium toxins in peanut, sorghum and maize from Mysore (India). J. Sci. Food Agric. 40:327-332, 1987.
016. BUSBY, W.F., Jr; WOGAN, G.N. - Trichothecenes. In: SHANK, R.C. (ed) "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol II, p.29-45, 1981.

017. CAMPBELL, A.D. - Sampling foodstuffs for mycotoxin analysis. Pure and Appl. Chem. 52:205-211, 1979.
018. CHANG, H.L.; DeVRIES, J.W.; LARSON, P.A.; PATEL, H.H. - Rapid determination of deoxynivalenol (Vomitoxin) by liquid chromatography using modified Romer column cleanup. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67(1):52-54, 1984.
019. CHAYTOR, J.P.; SAXBY, M.J. - Development of a method for the analysis of T-2 toxin in maize by gas chromatography-mass spectrometry. J. of Chrom. 237:107-113, 1982.
020. CIEGLER, A. - Trichothecenes: Occurrence and toxicoses. J. of Food Protection 41(5):399-403, 1978.
021. COHEN, H.; LAPOINTE, M. - Capillary gas chromatographic determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, and diacetoxyscirpenol in cereal grains. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67(6):1105-1107, 1984.
022. COLLINS, G.J.; ROSEN, J.D. - Distribution of T-2 toxin in wet-milled corn products. J. of Food Sci. 46:877-879, 1981.
023. COLLINS, G.J.; ROSEN, J.D. - Gas liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for T-2 toxin in milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62(6):1274-1280, 1979.
024. D'AGOSTINO, P.A.; PROVOST, L.R.; DROVER, D.R. - Analysis of trichothecenes mycotoxins in human blood by capillary column gas chromatography-ammonia chemical ionization mass spectrometry. J. of Chrom. 367(1):77-86, 1986.



025. DeVRIES, J.W.; CHANG, H.L. - Comparison of rapid high pressure liquid chromatographic and CB methods for determination of aflatoxins in corn and peanut. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65(2):206-209, 1982.
026. DURACKOVA, Z.; BETINA, V.; NEMEC, P. - Systematic analysis of mycotoxins by thin layer chromatography. J. of Chrom. 116(1):141-154, 1976.
027. DUTTON, M.; WESTLAKE, K. - Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(5):839-842, 1985.
028. EHRLICH, K.C.; LEE, L.S. - Mycotoxins in grain dust: method for analysis of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, vomitoxin and secalonic acid D. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67(5):963-967, 1984.
029. ELLISON, R.A.; KOTSONIS, F.N. - In vitro metabolism of T-2 toxin. Appl. Microb. 27(2):423-424, 1974.
030. EPPLEY, R.M. - Methods for the detection of trichothecenes. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58(5):906-908, 1975.
031. EPPLEY, R.M. - Trichothecenes and their analysis. J. Am. Oil Chem Soc. 56(9):824-829, 1979.
032. EPPLEY, R.M.; STOLOFF, L.; TRUCKSESS, M.W.; CHUNG, C.W. - Survey of corn for Fusarium toxins. J. Assoc. Anal. Chem. 57(3):632-635, 1974.

033. EUGENIO, C.P.; CHRISTENSEN, C.M.; MIROCHA, C.J. - Factors affecting production of the mycotoxin F-2 by Fusarium roseum. Phytopatology 60:1055-1057, 1970. Citado em SUTTON, J.C.; BALIKO, W.; FUNNELL, H.S. - Relation of weather variables to incidence of zearalenone in corn in Southern Ontario. Can. J. Plant Sci. 60:149-155, 1980.
034. FERNANDO, T.; BEAN, G. - Production of trichothecenes on cereal grains by Myrothecium spp. Food Chem. 20:235-240, 1986.
035. FRANCIS, O.J., Jr.; WARE, G.M.; CARMAN, A.S.; KUAN, S.S. - Thin layer chromatographic determination of sterigmatocystin in cheese. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(4):643-645, 1985.
036. GIMENO, A. - Rapid thin layer chromatographic determination of zearalenone in corn, sorghum, and wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem 66(3):565-569, 1983.
037. GIMENO, A. - Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitren A. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62(3):579-585, 1979.
038. GOLINSKI, P.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. - Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67(6):1108-1110, 1984.
039. GORE, J. R. DUGEREAU, A.; PERSON, O. - Determination of five trichothecenes as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography. J. of Chrom. 291:404-408, 1984.

040. GORST-ALLMAN, C.P.; STEYN, P.S. - Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. J. of Chrom. 175:325-331, 1979.
041. GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, P.; GOLINSKI, P.; CHELKOWSKI, J.; SZEBIOTKO, K. - Mycotoxins in cereal grain. Part XI. Simple multidection procedure for determination of 11 mycotoxins in cereals. Die Nahrung. 29(3):229-240, 1985.
042. GROVE, M.D.; BURMEISTER, H.R.; TAYLOR, S.L.; WEISLEDER, D.; PLATTNER, R.D. - Effects of chemical modification on the epoxy trichothecene. Induced feed refusal response. J. Agric. Food Chem. 32(3):541-544, 1984.
043. HAGAN, S.N.; TIETJEN, W.H. - A convenient thin layer chromatographic cleanup procedure for screening several mycotoxins in oils. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58(3):620-621, 1975.
044. HAGLER, W.M, Jr.; TYCZKOWSKA, K; HAMILTON, P.B. - Simultaneous occurrence of deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the Midwestern United States. Appl. Environ. Microb. 47(1):151-154, 1984.
045. HARRI, E.; LOEFFLER, W.; SIGG, H.P.; STAHELIN, H.; STOLL, C.; TAMM, C.; WIESINGER, D. Helv. Chim. Acta 45:839, 1962. Cited em BAMBURG, J.R. - The biological activities and detection of naturally occurring 12,13 epoxy trichothecenes. Clin. Toxicology 5(4):495-515, 1972.
046. HOBSON, W.; BAILEY, J.; FULLER, G.B. J. Toxicol. Environ. Health 3:43, 1977. Cited em BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L. Zearalenone in cereal grains. J. Am. Oil Chem. Soc. 56(9):812-819, 1979.

047. HOLADAY, C.E. - Rapid screening method for zearalenone in corn, wheat and sorghum. J. Am. Oil Chem. Soc. 57(6):491a-492a, 1980
048. HOLDER, C.L.; NONY, C.R.; BOWMAN, M.C. - Trace analysis of zearalenone and/or zearalenol in animal chow by HPLC and GLC. J. Assoc. Off. Anal. Chem 60(2):272-278, 1977.
049. HOOD, R.D.; KUCZUK, M.H.; SZCZECH, G.M. - Effects in mice of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and T2 toxin. Teratology 17:25, 1978. Cited in SHANK, R.C. (ed) "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. vol II, p.37, 1981.
050. HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYER, K.W. - Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63(6):1344-1354, 1980.
051. HOWELL, M.V.; TAYLOR, P.W. - Determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in mixed feeds, with detection by TLC or HPLC. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64(6):1356-1363, 1981.
052. HSU, I.; SMALLEY, E.B.; STRONG, F.M.; RIBELIN, W.E. - Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. Appl. Microb. 24(5):684-690, 1972.
053. ILLUS, T.; NIKU-PAAVOLA, M.L.; ENARI, T.M. - Chromatographic analysis of Fusarium toxins in grain samples. European J. Appl. Microb. Biotech. 11:244-247, 1981.
054. ISHII, K; UENO, Y. - Isolation and characterization of two new trichothecenes from Fusarium sporotrichioides strain M-1-1. Appl. Environ. Microb. 42(3):541-543, 1981.

055. JARVIS, B.B.; MAZZOLA, E.P. - Macrocyclic and other novel trichothecenes: Their structure, synthesis and biological significance. Acc. Chem. Res. 15(12):388-395, 1982.
056. JEMMALI, M.; UENO, Y.; ISHII, K.; FRAYSSINET, C.; ETIENNE, M. - Natural occurrence of trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, toxin T2) and zearalenone in corn. Separatum experientia 34:1333, 1978.
057. JOFFE, A.Z. - Alimentary toxic aleukia.. In: KADIS, S.; CIEGLER, A.; AJL, S.J. (eds) "Microbial toxins". Academic Press, New York, London. vol VII. p.139-187, 1971.
058. JOSEFSSON, E.; MOLLER, T. - High performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and zearalenone in cereals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62(5):1165-1168. 1979.
059. KAMIMURA, H.; NISHIJIMA, M.; YASUDA, K.; SAITO, K.; IBE, A.; NAGAYAMA, T.; USHIYAMA, H.; NAOI, Y. - Simultaneous detection of several Fusarium mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64(5):1067-1073, 1981
060. KAMIMURA, H.; NISHIJIMA, M.; YASUDA, K.; USHIYAMA, H.; TABATA, S.; MATSUMOTO, S.; NISHIMA, T. - Simple, rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(3):458-461, 1985.
061. KATO, T.; ASABE, Y.; SUZUKI, M.; TAKITANI, S. - Spectrophotometric and fluorimetric determinations of trichothecene mycotoxins with reagents for formaldehyde. Analytica Chimica Acta 106(1):59-65, 1979.

062. KRISHNAMURTHY, T.; SARVER, E.W.; GREENE, S.L.; JARVIS, B.B. - Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. II. Detection and quantification of macrocyclic trichothecenes by GC/negative ion chemical ionization mass spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70(1):132-140, 1987.
063. LEE, S.; CHU, F.S. - Radioimmuno assay of T-2 toxin in corn and wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64(1):156-161, 1981.
064. LEISTNER, L.; EDKhardt, Chr. - Schimmelpilze und Mykotoxine in Fleisch und Fleischerzeugnissen. In: REISS, J. (ed). "Mykotoxine in Lebensmitteln". Gustav Fischer, Stuttgart. p.297-341, 1981.
065. LeTUTOUR, B.; TANTAQUI-ELARAKI, A.; ABOUSSALIM, A. - Simultaneous thin layer chromatographic determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A in black olives. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67(3):611-612, 1984.
066. MARASAS, W.F.O.; KRIEK, N.P.J.; van RENSBURG, S.J.; STEYN, M.; van SCHALKWYK, G.C. - Occurrence of zearalenone and deoxynivalenol, mycotoxins produced by Fusarium graminearum Schwabe, in maize in Southern Africa. South African J. of Sci. 73:346-349, 1977.
067. MARTIN, P.M.D.; GILMAN, G.A. - A consideration of the mycotoxin hypothesis with special reference to the microflora of maize, sorghum, wheat and ground nuts. Rep. Trop. Prod. Inst. G 105: 112p, 1976. Citado em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds). "Mycotoxins: A canadian perspective". National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. Publicação nº 22848. p.77, 1985.

068. MARTIN, P.J.; STAHR, H.M.; HYDE, W.; DOMOTO, M. - Chromatography of trichothecene mycotoxins. J. of Liq. Chrom. 9(7):1591-1602, 1986.
069. MIGUEL, J.A.; DE ANDRES, V. - Metodo simple de determinacion simultanea de aflatoxinas, ocratoxina A y zearalenona en productos agricolas. An. INIA/Ser Ganadera 15:101-110. 1982.
070. MIGUEL, J.A.; DE ANDRES, V. - Micotoxinas en granos: determinacion rapida de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona y sterigmatocistina por cromatografia en capa fina de alta eficacia. An. INIA/Ser. Agrícola 27:89-99, 1984.
071. MIROCHA, C.J.; CHRISTENSEN, C.M.; NELSON, G.H. - F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from Fusarium. In: KADIS, S.; CIEGLER, A.; AJL, S.J. (eds) "Microbial toxins". Academic Press. New York, London. vol VII. p.107-138, 1971.
072. MIROCHA, C.J.; CHRISTENSEN, C.M.; NELSON, G.H. - Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicosis. Biotech. and Bioeng. 10:469-482, 1968.
073. MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V. - Mycotoxins. Their biosynthesis in fungi: Zearalenone biosynthesis. J. Food Prot. 42(10):821-824, 1979.
074. MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; BEHRENS, J. - Substances interfering with the GLC determination of T-2 mycotoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59(1):221-223, 1976.
075. MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; CHRISTENSEN, C.M. - Zearalenone In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A. (eds). "Mycotoxins in human and animal health". Pathotox Publishers, Inc, Park Forrest. Illinois. p.345-362, 1977.

076. MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; SCHAUERHAMER, B.; CHRISTENSEN, C.M.  
Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff. Appl. Environ. Microb. 32(4):553-556, 1976.
077. MIROCHA, C.J.; PAWLOSKY, R.A.; CHATTERJEE, K.; WATSON, S.; HAYES, W.  
- Analysis for Fusarium toxins in various samples implicated in biological warfare in Southeast Asia. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66(6):1485-1499, 1983.
078. MIROCHA, C.J.; SCHAUERHAMER, B.; CHRISTENSEN, C.M.; KOMMEDAHL, T.  
- Zearalenone, deoxynivalenol and T-2 toxin associated with stalk rot in corn. Appl. Environ. Microb. 38(3):557-558, 1979
079. MIROCHA, C.J.; SCHAUERHAMER, B.; PATHRE, S.V. - Isolation, detection and quantitation of zearalenone in maize and barley. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57(5):1104-1110, 1974.
080. MOLLER, T.E.; JOSEFSSON, E. - High performance liquid chromatography of zearalenone in cereals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61(4):789-792, 1978.
081. NAIK, D.M.; BUSCH, L.V.; BARRON, G.L. - Influence of temperature on the strain of Fusarium graminearum Schwabe, in zearalenone production. Can. J. Plant Sci. 58:1095-1097, 1978.
082. NESHEIM, S. - Method of aflatoxin analysis. National Bureau of standards special publications 519. Trace organic analysis: A new frontier in Analytical Chemistry, proceedings of the 9 materials research symposium. April 10-13, 1978, held at NBS, Gaithersburg, Md (Issued april 1979) p. 355-372



083. NIKU-PAAVOLA, M.L.; ILUS, T.; WARD, P.J.; NUMMI, M. - Thin layer analysis of Fusarium toxins in grain samples. Archives de L'Institute Pasteur Tunis 54(3-4):269-277, 1977.
084. NOWOTNY, P.; BALTES, W.; KRONERT, W.; WEBER, R. - Hochleistungsflüssigkeitsschromatographische Bestimmung von Ochratoxin A in weizen kleie. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 8:29-31, 1983.
085. ORTH, R. - Einfluss physikalischer Faktoren auf die Bildung von Mykotoxinen. In: REISS, J. (ed). "Mykotoxine in Lebensmitteln". Gustav Fischer, Stuttgart. p.85-100, 1981.
086. PATHRE, S.; MIROCHA, C.J. - Assay methods for trichothecenes and review of their natural occurrence In: RODRIKS, C.W.; HESSELTINE, C.W.; NEHLMAN, M.A.(eds) "Mycotoxins in human and animal health" Pathotox Publishers, Inc., Park Forrest South. Illinois. p.229-253, 1977.
087. PATHRE, S.V.; MIROCHA, C.J. - Trichothecenes: natural occurrence and potencial hazard. J. Am. Oil Chem. Soc. 56(9):820-823, 1979.
088. PATTERSON, D.S.P.; ROBERTS, B.A. - Mycotoxins in animal feedstuffs: sensitive TLC detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone and T-2 toxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62(6):1265-1267, 1979.
089. PESTKA, J.J.; LEE, S.C.; LAU, H.P.; CHU, F.S. - Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin. J. Am. Oil Chem. Soc. 58(12):940a-944a, 1981.

090. PETTERSSON, H.; KIESSLING, K.H.; SANDHOLM, K. - Occurrence of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) in Swedish grown cereals. Swedish J. Agric. Res. 16:179-182, 1986.
091. PIER, A.C.; CYSEWSKI, S.J.; RICHARD, J.L.; THURSTON, J.R. - Mycotoxin as a veterinary problem. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A. (eds) "Mycotoxins in human and animal health". Pathotox Publishers, Inc. Park Forrest South. Illinois. p.745-750, 1977.
092. PONS, W.A, Jr.; FRANZ, A.O, Jr. - High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60(1):89-95, 1977.
093. RAO, G.V.; RAO, P.S.; GIRISHAM, S.; REDDY, S.M. - A novel spray reagent for chromatographic detection of trichothecene toxins. Current Science 54(11):507-509, 1985.
094. RICHARDSON, K.E.; HAGLER, Jr, W.M.; HAMILTON, P.B. - Method for detecting production of zearalenone, zearalenol, T-2 toxin, and deoxynivalenol by Fusarium isolates. Appl. Environ. Microb. 47(4):643-646, 1984.
095. RICHARDSON, K.E.; HAGLER, W.M, Jr.; MIROCHA, C.J. - Production of zearalenone,  $\alpha$  and  $\beta$  zearalenol by Fusarium spp in rice culture. J. Agric. Food Chem. 33:862-866, 1985.
096. ROBB, J.; NORVAL, M. - Comparison of citotoxicity and thin layer chromatographic methods for detection of mycotoxins. Appl. Environ. Microb. 46(4):948-950, 1983.
097. ROBERTS, B.A.; PATTERSON, D.S.P. - Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs, using a novel membrane cleanup procedure. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58(6):1178-1181, 1975.

098. ROMER, T.R. - Analytical approaches to the trichothecene mycotoxins. Cereal Foods World 22(10):521-523, 1977.
099. ROMER, T.R. - Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69(4):699-703, 1986.
100. ROMER, T.R.; BOLING, T.M.; MacDONALD, J.L. - Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61(4):801-808, 1978.
101. ROOD, H.D, Jr; BUCK, W.B.; SWANSON. S.P. - Gas chromatographic screening method for T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, and related trichothecenes in feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71(3):493-498, 1988.
102. ROSEN, R.T.; ROSEN, J.D. -- Presence of four Fusarium mycotoxins and synthetic material in "yellow rain". Biomedical Mass Spectrom. 9(10):443-450, 1982.
103. ROSEN, R.T.; ROSEN, J.D. - Quantification and confirmation of four Fusarium mycotoxins in corn by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. J. of Chrom. 283:223-230, 1984.
104. SANO, A.; ASABE, Y.; TAKITANI, S.; UENO, Y. - Fluorodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with nicotinamide and 2-acetylpyridine on a silica gel layer. J. of Chrom. 235:257-265, 1982.
105. SARUDI. I, Jr. - Hydrogenation used in the detection of zearaleno-  
ne (F-2 toxin). Acta Alimentaria 5(1):37-40, 1976.

106. SCHIEFFER, H.B. - Nutritional and toxicological effects in livestock. Toxicology. In: SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D.(eds) "Mycotoxins: A canadian perspective". National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. Publicação nº 22848. p.81-92, 1985.
107. SCHMIDT, R.; ZIEGENHAGEN, E.; DOSE, K. - High performance liquid chromatography of trichothecenes. 1- Detection of T-2 e HT-2 toxin. J. of Chrom. 212:370-373, 1981.
108. SCHWEIGHARDT, H.; BOHM, J.; ABDELHAMID, A.M.; LEIBETSEDER, J.; SCHUH, M.; GLAWISCHNIG, E. - Analysis of the fusariotoxins zearalenone and vomitoxin (deoxynivalenol) in human foods and animal feeds by HPLC. Chromatog. 13(7):447-450, 1980.
109. SCOTT, P.M. - Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65(4):876-883, 1982.
110. SCOTT, P.M. - Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. J. of Food Prot. 41(5):385-398, 1978.
111. SCOTT, P.M.; LAU, P.; KANHERE, S.R. - Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64(6):1364-1371, 1981.
112. SCOTT, P.M.; PANALAKS, T.; KANHERE, S.; MILES, W.F. - Determination of zearalenone in corn flakes and other corn based foods by TLC, HPLC, GLC/high resolution mass spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61(3):593-600, 1978.

113. SEITZ, L.M.; MOHR, H.E. - Simple method for simultaneous detection of aflatoxin and zearalenone in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59(1):106-109, 1976.
114. SHOTWELL, O.L.; BENNETT, G.A.; GOULDEN, M.L.; PLATTNER, R.D.; HESSELTINE, C.W. - Survey for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin in United State. Grain sorghum from 1975 and 1976 crops. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63(4):922-926, 1980.
115. SHOTWELL, O.L.; BENNETT, G.A.; STUBBLEFIELD, R.D.; SHANNON, G.M.; KWOLEK, W.F.; PLATTNER, R.D. - Deoxynivalenol in hard red winter wheat: relationship between toxin levels and factors that could be used in grading. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(5):954-957, 1985.
116. SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; BENNETT, G.A.; PLATTNER, R.D.; HESSELTINE, C.W. - Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone and ochratoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60(4):778-783, 1977.
117. SNYDER, A.P. - Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. J. of Food Protec. 49(7):544-569, 1986.
118. SOARES, L.M.V. - Micotoxinas: um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas. Tese apresentada à faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências de alimentos. 1987
119. SOARES, L.M.V.; AMAYA, D.R. - Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(6):1128-1129, 1985.

120. SORSA, M.; LINNAINMAA, K.; PENTTILA, M.; ILUS, T. - Brief reports: Evaluation of the mutagenicity of epoxytrichothecene mycotoxins in Drosophila melanogaster. Hereditas 92:163-165, 1980.
121. STAHR, H.M.; KRAFT, A.A.; SCHUH, M. - The determination of T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and deoxynivalenol in foods and feeds. Appl. Spect. 33(3):294-297, 1979.
122. STAHR, H.M.; LERDAL, D.; HYDE, W.; PFEIFFER, R. - Analysis of trichothecene mycotoxins. Appl. Spect. 37(4):396-400, 1983.
123. STAHR, H.M.; ROSS, P.F.; HYDE, W.; OBIOHA, W. - Scirpene toxin analyses of feed associated with animal intoxication. Appl. Spect. 32(2):167-174, 1978.
124. STAHR, H.M.; ROSS, P.F.; OBIOHA, W. - Some mycotoxin levels in farm-stored corn. J. Agric. Food Chem. 29:207, 1981.
125. STANFORD, G.K.; HOOD, R.D.; HAYES, A.W. - Effect of prenatal administration of T-2 toxin to mice. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol 10:743, 1975. Citado em SHANK, R.C. (ed). "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol II, p.37, 1985.
126. STEYN, P.S.; VLEGGAAR, R.; RABIE, C.J.; KRIEK, N.P.J. HARRINGTON, J.S. - Trichothecene mycotoxins from Fusarium sulphureum. Phytochemistry 17(5):949-951, 1978.
127. STILL, W.C.; OHMIZU, H. - Synthesis of verrucarin A. J. Org. Chem. 46(25):5242-5244, 1981.

128. STOLOFF, L.; NESHEIM, S.; YIN, L.; RODRICKS, J.V.; STACK, M.; CAMPBELL, A.B. - A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54(1):91-97, 1971.
129. SUTTON, J.C.; BALIKO, W.; FUNNELL, H.S. - Relation of weather variables to incidence of zearalenone in corn in Southern Ontario. Can. J. Plant Sci. 60:149-155, 1980.
130. SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G. - The simultaneous determination of diacetoxyscirpenol and T-2 toxin in fungal cultures and grain samples by capillary gas chromatography. Food Addit. and Contam. 4(3):277-284, 1987.
131. SZATHMARY, Cs; GALACZ, J.; VIDA, L.; ALEXANDER, G. - Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of some mycotoxins causing fusariotoxicoses in animals. J. of Chrom. 191:327-331, 1980.
132. TAKEDA, Y.; ISOHATA, E.; AMANO, R.; UCHIYAMA, M. - Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains. J. Assoc. Off. Anal. Chem 62(3):573-578, 1979.
133. TAKITANI, S.; ASABE, Y.; KATO, T.; SUZUKI, M.; UENO, Y. - Spectro-densitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4-(p-nitrobenzyl)pyridine on silica gel thin-layer chromatograms. J. of Chrom. 172:335-342, 1979.
134. TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; ISHII, K.; UENO, Y. - Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. Food Addit. and Contam. 2(2):125-137, 1985.

135. TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; LEE, U.; UENO, Y. - A limited survey of Fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone in 1984 UK harvested wheat and barley. Food Addit. and Contamin. 3(3):247-252, 1986.
136. TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; LEE, U.; UENO, Y. - Rapid and sensitive determination of zearalenone in cereals by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. of Chrom. 328:271-278, 1985.
137. TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; MATSUI, Y.; LEE, U.S.; UENO, Y. - Co-contamination of the Fusarium mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone, in scabby wheat grains harvested in Hokkaido, Japan. J. Food Hyg. Japan. 26(5):519-522, 1985.
138. TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; UENO, Y. - A survey of the occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in foodstuffs and health foods in Japan. Food Addit. and Contam. 2(4):259-265, 1985.
139. TATSUNO, T.; OHTSUBO, K.; SAITO, M. - Chemical and biological detection of 12,13 epoxytrichothecenes isolated from Fusarium sp. Pure Appl. Chem. 35:309-313, 1973.
140. THOMAS, F.; EPPLEY, R.M.; TRUCKSESS, M.W. - Rapid screening method for aflatoxins and zearalenone in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58(1):114-116, 1975.
141. THOMPSON, W.Z.; WANNEMACHER, R.W, Jr. - Structure-function relationships of 12,13 epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. Toxicol 24(10):985-994, 1986.



142. TRENHOLM, H.L.; FARNWORTH, E.R.; FRIEND, D.W. - Zearalenone. In: SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D.(eds). "Mycotoxins: A canadian perspective". National Research Council of Canada. Ottawa, Canada. Publicação nº 22848. p.21-22, 1985.
143. TRENHOLM, H.L.; HAMILTON, R.M.G.; FRIEND, D.W.; FARNWORTH, E.R. Trichothecenes. In: SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds). "Mycotoxins: A canadian perspective". National Research Council of Canada. Ottawa, Canada. Publicação nº 22848. p.19-21, 1985.
144. TRENHOLM, H.L.; HAMILTON, R.M.G.; FRIEND, D.W.; THOMPSON, B.K.; HARTIN, K.E. - Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol) contaminated wheat: Effects on swine, poultry and dairy cattle. JAVMA 185:527-531, 1984. Citado em PETERSSON, H.; KIESSLING, K.H.; SANDHOLM, K. - Occurrence of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) in Swedish grown cereals. Swedish J. Agric. Res. 16:179-182, 1986.
145. TRENHOLM, H.L.; WARNER, R.M.; FITZPATRICK, D.W. - Rapid sensitive liquid chromatographic method for determination of zearalenone and  $\alpha$  and  $\beta$  zearalenol in wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67(5):968-972, 1984.
146. TRUCKSESS, M.W.; FLOOD, M.T.; PAGE, S.W. - Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in processed grain products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69(1):35-36, 1986.
147. TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S.; EPPLEY, R.M. - Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67(1):40-43, 1984.

148. UENO, Y. - Historical background of trichothecene problems. In: UENO, Y. (ed). "Trichothecenes- Chemical, biological and toxicological aspects." Amsterdam Elsevier. p.1-6, 1983. Citado em TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; ISHII, K.; UENO, Y. Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. Food Addit. and Contam. 2(2):125-137, 1985.
149. UENO, Y. - Mode of action of trichothecenes. Pure Appl. Chem. 49:1737-1745, 1977.
150. UENO, Y. - Trichothecene mycotoxins . Mycology, chemistry and toxicology. Adv. in Nut. Res. 3:301-353. 1980.
151. UENO, Y. - Trichothecenes: Overview address. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN; M.A.(eds). "Mycotoxins in human and animal health". Pathotox Publishers, Inc. Park Forrest South. Illinois. p.189-207, 1977.
152. UENO, Y.; ISHII, K.; SAKAI, K.; KANAEDA, S.; TSUNODA, H.; TANAKA, T.; ENOMOTO, M. - Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. IV. Microbial survey of "Bean hulls poisoning of horses" with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of Fusarium solani M-1-1. Jap. J. Exp. Med. 42:187, 1972. Citado em UENO, Y. - Trichothecene mycotoxins. Mycology, chemistry and toxicology. Adv. in Nut. Res. 3:301-353, 1980.
153. UENO, Y.; TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; HU, Z.H.; XU, D.D. - Deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in scabby wheat from Shangai, China. J. Food Hyg. Soc. Japan 27(2):180-182, 1986.

154. WARE, G.M.; THORPE, C.M. - Determination of zearalenone in corn by HPLC and fluorescence detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61(5):1058-1062, 1978.
155. WEAVER, G.A.; KURTZ, H.J.; MIROCHA, C.J.; BATES, F.Y.; BEHRENS, J.C.; ROBISON, T.S. Can. Vet. J. 19:310, 1978. Citado em PATHRE, S.V.; MIROCHA, C.J. - Trichothecenes: Natural occurrence and potential hazard. J. Am. Oil Chem. Soc. 56(9):820-823, 1979.
156. WEHNER, F.C.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. - Lack of mutagenicity to Salmonella typhimurium of some Fusarium mycotoxins. Appl. Environ. Microb. 35(4):659-662, 1978.
157. WEI, R.D.; STRONG, F.M.; SMALLEY, E.B.; SCHNOES, H.K. - Chemical interconversion of T-2 e HT-2 toxins and related compounds. Bioch. and Biophys. Res. Comm. 45(2):396-401, 1971.
158. WHIDDEN, M.P.; DAVIS, N.D.; DIENER, V.L. - Detection of rubra-toxin B and seven other mtcotoxins in corn. J. Agric. Food Chem. 28(4):784-786, 1980.
159. WISEMAN, H.G.; JACOBSON, W.C.; HARMEYER, W.C. - Note on removal of pigments from chloroform extracts of aflatoxin cultures with copper carbonate. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50(4):982-983, 1967.
160. WYLLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. (ed). "Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses" vol 1. Marcel Dekker, New York, p.383-420, 1977

161. YAGEN, B.; JOFFE, A.Z.; HORN, P.; MOR, N.; LUTSKY, I.I. - Toxins from a strain involved in ATA. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A. (ed). "Mycotoxins in human and animal health". Pathotox Publishers, Inc. Park Forrest South. Illinois. p.329-335, 1977.
162. YAGEN, B.; SINTOV, A.; BIALER, M. - New sensitive TLC-HPLC method for detection of trichothecene mycotoxins. J. of Chrom. 356(1):195-201, 1986.
163. YOSHIZAWA, T.; HOSOKAWA, H. - Natural co-occurrence of deoxynivalenol and nivalenol, trichothecene mycotoxins, in commercial foods. J. of Food Hyg. Soc. Japan 24(4):413-415, 1983.

## AGRADECIMENTOS

A Profª Drª Lucia Maria Valente Soares, pela orientação desta tese, pelo estímulo e pela constância em sua disponibilidade e dedicação.

A diretoria do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), pelo afastamento concedido para a realização desta pós-graduação.

Aos Profsª Drsª Jaime Amaya Farfán, Celina Raquel Oliveira Camargo e Maria Cecília de Toledo, pelas sugestões apresentadas para a redação final da tese.

Ao Profª Laertes Francisco Marochi, pela revisão gramatical do texto.

Ao Profª Ademar Purchio, pelas cepas de F. poae NRRL 3511 (1982) e E. sporotrichioides NRRL 3510 (1982) cedidas.

A Associação Brasileira de Indústria de Alimentos (ABIA), pela colaboração na impressão da tese.

Aos colegas de laboratório, pelo companheirismo.

Aos amigos, pela compreensão, disponibilidade e amizade nos momentos compartilhados.