

TRICOTECENOS EM TRIGO: UM ESTUDO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA, INCIDÊNCIA, CONTAMINAÇÃO SIMULTÂNEA POR
OUTRAS MICOTOXINAS E DE ALGUNS FATORES QUE INFLUEM
NA PRODUÇÃO NO CAMPO

39/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Tricotecenos em trigo: Um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que

Parecer influem na produção no campo

Este exemplar corresponde a relação final da tese defendida por Eliana Badiãle Furlong e aprovada pelo comitê julgadora em 04.12.92.

Eliana Badiãle Furlong

Farmacêutica-Bioquímica

Mestre em Ciência de Alimentos

Lucia Valente Soares

Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares†

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas, SP., 1992

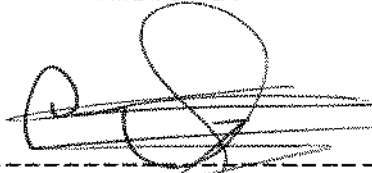
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares
(orientadora)



Prof. Dr. Antonio Luiz Pires Valente
(membro)



Prof. Dr. Benedito Corrêa
(membro)

Suplente

Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins
(membro)



Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(membro)

Suplente

Profa. Dra. Heloisa Mascia Cecchi
(membro)



Profa. Dra. Myrna Sabino
(membro)

Campinas, 04 de dezembro de 1992.

Ao Francis,
que me tem amado...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares, pela orientação, apoio e amizade.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas a redação final da tese.

À Universidade do Rio Grande pela oportunidade.

À CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Carlos Eduardo Camargo do Instituto Agrômico de Campinas, pela doação das amostras.

Às pesquisadoras Célia de Campos Lasca e Elizabete Y. Kohara, do Instituto Biológico de São Paulo, pelo exame fitossanitário das sementes.

À ABIA, pelas cópias da tese.

Ao Prof. Tabajara Lucas de Almeida e ao pessoal do Laboratório de Estatística da Universidade do Rio Grande, pela colaboração durante a realização da análise estatística.

Aos colegas professores Heitor Vieira, José Filgueras, Maria Regina Bueno Franco e Walter Augusto Ruiz pela colaboração e amizade.

Aos amigos do laboratório de Análise de Alimentos, pela oportunidade de tê-los conhecido e convivido amigavelmente.

À amiga Neura Bragagnolo, pelo apoio em todas as horas.

Aos meus pais, Tecla e Angelo, e irmãos Célia e Renato por me ajudarem a viver mais esta experiência.

Ao Vitor, por existir ...

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 - Tricotecenos.....	3
2.1.1 - Natureza Química.....	4
2.1.2 - Efeitos Tóxicos.....	6

2.1.3 - Fatores que influenciam o desenvolvimento dos fungos produtores e fatores que induzem a produção de tricotecenos.....	9
2.1.4 - Ocorrência no âmbito internacional.....	13
2.1.5 - Ocorrência no Brasil.....	16
2.2 - Metodologia Analítica para determinação de tricotecenos.....	20
2.2.1 - Métodos Cromatográficos.....	21
2.2.1.1 - Cromatografia em papel.....	21
2.2.1.2 - Cromatografia de Camada Delgada.....	24
2.2.1.3 - Cromatografia Gasosa.....	23
2.2.1.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	27
2.2.1.5 - Confirmação de identidade.....	32
2.2.2 - Métodos Espectrométricos e Eletroquímicos.....	33
2.2.3 - Métodos Enzimáticos.....	34
2.2.4 - Imunoensaios.....	35
2.2.5 - Métodos Biológicos.....	36
2.3- Outras micotoxinas.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. Reagentes, Solventes e Soluções.....	41
3.2. Equipamentos.....	41

3.3. Amostras.....	42
3.3.1. Seleção e coleta de amostras.....	42
3.3.2. Preparo e armazenamento de amostra para análise....	42
3.4.- Determinação de Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , Esterigmatocistina, Ocratoxina A e Zearalenona.....	44
3.5.- Desenvolvimento de um procedimento para determi- nação de tricotenos em grãos de trigo (<u>Triticum</u> <u>aestivum</u> , L) por cromatografia gasosa.....	44
3.5.1.- Preparo de padrões de tricotecenos.....	44
3.5.2 - Avaliação da pureza dos padrões dos tricotecenos..	45
3.5.3 - Estudo de parâmetros que influenciam a derivação de tricotecenos por HFBI.....	46
3.5.4 - Otimização das condições para cromatografia gasosa de tricotecenos.....	46
3.5.5 - Determinação dos tempos de retenção dos padrões de tricotecenos.....	46
3.5.6.- Curvas padrão de tricotecenos.....	47
3.5.7 - Extração e limpeza de grãos de trigo.....	48
3.6 - Avaliação da metodologia desenvolvida.....	49
3.6.1 - Teste de Rusticidade.....	49
3.6.2 - Recuperação.....	51
3.6.3 - Repetibilidade em amostras fortificadas.....	51
3.6.4 - Repetibilidade em amostras naturalmente conta- minadas.....	51

3.7 - Procedimento proposto para determinação de DAS, DON, NIV, HT2, T2, T2 triol e T2 tetraol em trigo.....	51
3.8 - Confirmação.....	54
3.8.1 - Acetilação.....	54
3.8.2 - Hidrólise.....	54
3.8.3 - Redução.....	55
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 - Desenvolvimento de metodologia para determinação de tricotecenos por cromatografia gasosa.....	56
4.1.1 - Concentração dos padrões.....	56
4.1.2 - Avaliação da pureza dos padrões.....	57
4.1.3 - Parâmetros que influenciam a derivação com heptafluorobutirilimidazol (HFBI).....	58
4.1.4 - Condições para determinação por cromatografia gasosa.....	59
4.1.5 - Determinação dos fatores de separação com relação a um padrão interno.....	60
4.1.6 - Quantificação.....	61
4.1.7 - Extração e limpeza.....	64
4.2 - Avaliação da metodologia desenvolvida.....	65
4.2.1 - Teste de rusticidade.....	65

4.2.2 - Recuperação.....	68
4.2.3 - Repetibilidade das amostras contaminadas artificial e naturalmente.....	69
4.2.4 - Limites de detecção de tricotecenos.....	71
4.3 - Procedimento para confirmação de identidade.....	72
4.3.1 - Acetilação.....	72
4.3.2 - Hidrólise.....	72
4.3.3 - Redução.....	73
4.4 - Incidência de tricotecenos e outras micotoxinas nos campos experimentais do estado de São Paulo.....	78
4.4.1 - Aspecto do Trigo.....	78
4.4.2 - Incidência de tricotecenos.....	79
4.4.3 - Dados climatológicos.....	80
4.4.4 - Microbiota fúngica.....	82
4.4.5 - Incidência de outras micotoxinas.....	83
4.4.6 - Avaliação da influência de fatores bióticos e abióticos na produção de tricotecenos.....	84
4.5 - Incidência de tricotecenos e outras micotoxinas e microbiota fúngica em trigo nacional e importado no sul do Rio Grande do Sul.....	92
4.5.1 - Aspecto do trigo.....	92
4.5.2 - Incidência de tricotecenos.....	92

4.5.3 - Incidência de outras micotoxinas.....	94
4.5.4 - Microbiota fúngica.....	94
5- CONCLUSÕES.....	95
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Destruição ou perda de tricotecenos durante diversos processamentos de trigo.....	16
Tabela 2 - Ocorrência de <u>Fusarium</u> em Grãos no Brasil.....	19
Tabela 3 - Determinação de tricotecenos por cromatografia gasosa.....	28
Tabela 4 - Testes biológicos.....	36
Tabela 5 - Aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina e zearalenona, suas características químicas e toxigênicas e incidência em alimentos.....	38
Tabela 6 - Resultados da avaliação intra-laboratorial do método multitoxina preconizado por Soares (1987).....	40
Tabela 7 - Variáveis examinadas no teste de rusticidade..	50
Tabela 8 - Tempos de retenção ajustados (t'_R) dos tricotecenos heptafluorobutilados e tempos de retenção relativos (r_{pi}) com relação ao metil araquidato.....	61
Tabela 9 - Porcentagens de diacetoxiscirpenol (DAS) e nívalenol (NIV) recuperadas e diferenças nas combinações de condições durante o teste de rusticidade.....	67

Tabela 10 - Recuperação de Diacetoxiscirpenol.....	68
Tabela 11 - Recuperação de Nivalenol.....	69
Tabela 12 - Repetibilidade das amostras natural e artificialmente contaminadas.....	70
Tabela 13 - Limites de detecção do método proposto para determinação de tricotecenos.....	71
Tabela 14 - tempo de retenção (r_{p1}) dos tricotecenos ^(a) após reações de derivação ^(b)	73
Tabela 15 - Incidência de tricotecenos em trigo cultivado em estações experimentais no Estado de São Paulo.....	79
Tabela 16 - Dados climatológicos das estações experimentais do Instituto Agronômico de Campinas: precipitação pluviométrica (mm H ₂ O); temperatura média (°C) e umidade relativa (%UR) no período de abril a outubro de 199.0.....	81
Tabela 17 - Porcentagens de fungos relatados como produtores de tricotecenos encontrados na variedade BH1146.....	82
Tabela 18 - Porcentagens de fungos relatados como produtores de tricotecenos encontrados na variedade IAC24.....	83
Tabela 19 - Outras micotoxinas presentes nas amostras do Estado de São Paulo.....	84
Tabela 20 - Matriz utilizada para análise de regressão múltipla das variáveis bióticas e abióticas...	85

Tabela 21 - Regressão da variável DAS com as variáveis abióticas e bióticas com exceção da umidade relativa.....	86
Tabela 22 - Regressão da variável DON com as variáveis abióticas e bióticas com exceção da umidade relativa.....	87
Tabela 23 - Regressão da variável DON com variáveis abióticas e bióticas.....	88
Tabela 24 - Regressão da variável NIV com variáveis abióticas e bióticas com exceção da umidade relativa.....	89
Tabela 25 - Regressão da variável NIV com as variáveis abióticas e bióticas.....	90
Tabela 26 - Regressão da variável toxina T2 com variáveis abióticas e bióticas com exceção da umidade relativa.....	91
Tabela 27 - Regressão da variável toxina T2 com variáveis abióticas e bióticas.....	92
Tabela 28 - Incidência de micotoxinas em 18 amostras de trigo proveniente de silos e armazens de Rio Grande, RS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Estrutura e Sistema de numeração dos tricotecenos.....	4
Figura 2 - Etapas de cultivo e utilização dos cereais que podem envolver produção e destruição de micotoxinas (segundo Mills, 1989).....	10
Figura 3 - Localização dos campos experimentais de trigo do Instituto Agrônomico de Campinas.....	43
Figura 4 - Método proposto para determinação de tricotecenos em amostras de trigo.....	53
Figura 5 - Perfil cromatográfico de separação de tricotecenos.....	62
Figura 6 - Curvas padrão de toxina T2.....	63
Figura 7 - Sistemas de extração, clarificação e limpeza de amostras e seus perfis cromatográficos.....	66
Figura 8 - Amostra não contaminada.....	75
Figura 9 - Amostra presuntiva de contaminação com DAS e sua confirmação.....	76
Figura 10- Amostra presuntiva de contaminação com DON e NIV e sua confirmação.....	77

RESUMO

Tricotecenos tem sido encontrados em grãos diversos em todo o mundo. Intoxicações em animais que consumiram rações contaminados com Fusarium são frequentemente relatadas no sul do Brasil. No entanto, não existem dados sobre a incidência de tricotecenos em alimentos ou rações no país. Uma das razões desta lacuna pode ser a falta de métodos analíticos adaptáveis às condições dos laboratórios nacionais.

No presente trabalho foi desenvolvido e avaliado, um método para determinação e confirmação de sete tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiscirpenol, toxinas T2 e HT2, T2 triol e T2 tetraol) em trigo. A etapa de extração emprega metanol/ KCl 4% (9+1). A limpeza é obtida através de uma clarificação com sulfato de amônia (30%), seguida de partição para clorofórmio e uma passagem através de uma coluna de carvão ativo/celite/alumina (7:3:5). Derivação com heptafluorobutirilimidazol é realizada previamente à separação das toxinas por cromatografia gasosa utilizando uma coluna capilar de sílica fundida de 15m x 0,32mm DB225 e detecção por ionização em chama. A confirmação envolve acetilação, hidrólise ou redução. Os limites de detecção variam de 0,1 a 0,5 mg/kg. A recuperação média é de 88% para tricotecenos do grupo A e 92% para tricotecenos do grupo B. A repetibilidade para amostras naturalmente contaminadas variaram de 2,8% a 12,9%, para cada tricoteceno individualmente determinado. Amostras fortificadas mostraram um comportamento semelhante com coeficientes de variação de 4,6 a 11,9%.

O método proposto foi usado para análise de 20 amostras de duas variedades de trigo (BH146 e IAC24) colhidas em dez localidades do Estado de São Paulo. Deoxinivalenol (0,47 - 0,58 mg/kg), nivalenol (0,16-0,40 mg/kg), diacetoxiscirpenol (0,60 mg/kg) e toxina T2 (0,80 mg/kg) foram detectados em seis amostras. A possibilidade de contaminação com aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂,

ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina foi investigada. Três das amostras contendo tricotecenos também apresentaram zearalenona (40-208 ug/kg).

Correlação entre contaminação e variáveis como, fungos presentes nas amostras, variedade de trigo, condições climáticas durante desenvolvimento e colheita dos grãos e localização geográfica, foram estudadas por análise de regressão múltipla. A presença de fungos toxigênicos e altos índices pluviométricos, durante os estágios susceptíveis a contaminação no desenvolvimento da semente, surgiram como os fatores mais importantes.

Dezoito amostras de trigo coletadas em elevadores e outros tipos de armazenamento no sul do Estado do Rio Grande do Sul, foram também analisados para as mesmas micotoxinas mencionadas. Diacetoxiscirpenol (0,30 mg/kg), deoxinivalenol (0,40 mg/kg), toxina T2 (0,36 mg/kg), T2 tetraol (1,68 mg/kg) e ocratoxina A (40 ug/kg) foram encontrados em duas amostras de trigo argentino e uma amostra de trigo nacional.

SUMMARY

Trichothecenes have been shown to occur in grain crops all over the world. Animal intoxications caused by ingestion of Fusarium infected feed are frequently reported in the south of Brasil. However, data is lacking on the incidence of trichothecenes either in foods or feeds. One of the reasons for this shortage of information may be the need for analytical methods more ammenable to the laboratory conditions prevailing in the country.

In the present work a method for determination and confirmation of seven trichothecenes (deoxynivalenol, nivalenol, diacetoxyscirpenol, toxins T2 and HT2, T2 triol and T2 tetraol) in wheat, has been developed and evaluated. Extraction employs methanol/4% KCl (9+1). The cleanup is accomplished through a clarifying step with ammonium sulfate (30%) followed by partition to chloroform and a passage through a carbon/celite/alumina (7:3:5) column. Derivatization with heptafluorobutyrylimidazol is conducted before separation by gas chromatography on a 15m x 0.32mm DB225 fused silica capillary column and detection by a flame ionization detector. Confirmation procedures involved acetylation, hydrolysis or reduction. The detection limits varied from 0.1 to 0.5 mg/kg. Average recovery obtained was 88% for group A trichothecenes and 92% for group B. Repeatability for naturally contaminated samples in terms of relative standard deviation (RSD), ranged from 2.8% to 12.9% for the individual determinations of trichothecenes. Spiked samples showed a similar trend with RSD spanning from 4.6% to 11.9%.

The proposed method was used to analyse samples of two varieties of wheat (BH146 and IAC24) harvested in ten different locations of the state of São Paulo.

Deoxynivalenol (0.47-0.58 mg/kg), nivalenol (0.16-0.40 mg/kg), diacetoxyscirpenol (0.60 mg/kg) and T2 toxin (0.80 mg/kg) were found in six samples. The possibility of contamination with aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin was also investigated. Zearalenone (40 - 208 ug/kg) was found in three of the samples containing trichothecenes.

Correlations between contamination and variables such as fungi present in the samples, wheat variety, weather conditions during seed development and harvest and geographical location were studied by multiple regression analysis. The presence of toxigenic fungi plus high levels of rain during the susceptible stage of the seed development proved to be the most important factors.

Eighteen samples of wheat, collected in grain elevators and other storage facilities in the south of the state of Rio Grande do Sul, were also analysed for the same mycotoxins as above. Diacetoxyscirpenol (0.30 mg/kg), deoxynivalenol (0.40 mg/kg), toxin T2 (0.36 mg/kg), T2 tetraol (1.68 mg/kg) and ochratoxin A (40 ug/kg) were found in two samples of Argentinian wheat and one sample of Brazilian wheat.

1- INTRODUÇÃO

A cultura de trigo tem assumido uma grande importância para o país em função da crescente demanda, como pode se verificar pelo aumento de 50% no consumo per capita ocorrido entre 1970 e 1980. A produtividade brasileira é, em média, 50% da mundial. Por várias razões, entre elas, doenças, a produção nacional não vem atendendo as necessidades internas, tornando necessária a importação.

As condições climáticas nos países tradicionalmente exportadores de trigo favorecem o crescimento de fungos e a produção de toxinas, tornando importante a capacitação a nível nacional para análise de micotoxinas em grãos importados.

As regiões sul e sudeste do Brasil são as maiores produtoras de cereais, principalmente de soja e trigo. Na região sul, ocorrem invernos frios e úmidos, com temperaturas médias entre 10 e 15°C e umidade relativa entre 70 e 90%. Estas condições são especialmente propícias a produção de tricotecenos por fungos do gênero Fusarium. Na região sudeste, o Estado de São Paulo, o terceiro em produção de trigo no país, possui em algumas zonas tritícolas clima muito semelhante aos verificados no sul do país. Tal situação climática coincide com a época de floração e formação do grão de trigo, justamente quando a semente está mais susceptível a contaminação por fungos de campo.

As diferentes espécies de Fusarium podem produzir diversas micotoxinas, mas são mais conhecidos os tricotecenos e a zearalenona. Os tricotecenos constituem um grupo de mais de cem compostos sesquiterpenóides, com diferentes níveis de toxicidade. Vômitos, diarreia, erupções na pele, leucopenia, alterações no sistema hematopoiético e linfocitário tem sido os principais sintomas relatados em animais e humanos.

A zearalenona é uma toxina de caráter estrogênico e seus efeitos são frequentemente observados em animais de criação que consomem grãos contaminados por fungos.

Dentre as micotoxinas ainda não estudadas no Brasil e especialmente no trigo, estão os tricotecenos, cuja presença vem sendo constatada em diversas partes do mundo, inclusive na Argentina, cujas condições climáticas são muito semelhantes as do sul do Brasil e de onde provém grande parte do trigo importado.

Por outro lado, a necessidade de uma metodologia analítica capaz de determinação simultânea de tricotecenos nos alimentos vem sendo ressaltada por entidades como a Association of Official Analytical Chemists (General Referee Reports). Co-contaminação e interconversão de tricotecenos reforça a existência de uma lacuna nos métodos disponíveis.

Tendo em vista estas considerações os objetivos deste trabalho foram:

- 1) desenvolvimento de uma metodologia para determinação simultânea de sete tricotecenos (diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol, toxina HT2, nivalenol, toxina T2, T2 tetraol, T2 triol) em grãos de trigo, empregando cromatografia gasosa.
- 2) determinação de tricotecenos e outras micotoxinas (aflatoxinas B1, B2, G1, G2, esterigmatocistina, ocratoxina e zearalenona) em grãos de trigo cultivados em dez estações experimentais do Estado de São Paulo
- 3) verificação da correlação da incidência de tricotecenos com fatores bióticos e abióticos.
- 4) determinação de tricotecenos e outras micotoxinas em trigo armazenado e comercializado na região sul do Rio Grande do Sul.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Tricotecenos

Os tricotecenos são metabólitos produzidos por fungos dos gêneros Fusarium, Myrothecium, Tricothecium, Cephalosporium, Verticillium e Stachybotrys (Eppley, 1979; Ueno, 1983, 1986; Snyder, 1986; Scott 1988).

O nome tricoteceno para a estrutura destes metabólitos, caracterizada por um esqueleto tricíclico, formado por ciclohexano, ciclopentano e um anel furanóico e grupos metila substituindo alguns carbonos dos anéis, foi sugerido por Godtfredsen nos anos sessenta (Ueno, 1983).

Freeman e Morrison isolaram o primeiro composto deste grupo, o tricotecim, quando procuravam identificar a estrutura de um composto antifúngico produzido por culturas de Trichotecium roseum (Ueno 1983, 1986; Snyder 1986). Na década de sessenta novos compostos deste grupo foram isolados e caracterizados, entre eles: diacetoxiscirpenol, nivalenol, fusarenona X e toxina T2. Desde então, mais de cem tricotecenos foram isolados em laboratório, a partir de meios de cultura (Scott, 1988; Betina, 1989).

Os tricotecenos tem sido as micotoxinas mais estudadas, depois das aflatoxinas. Nos últimos trinta anos um volume considerável de informações com relação a sua estrutura, toxicologia, patologia, micologia e bioquímica vem sendo coletadas (Snyder, 1986).

2.1.1 - Natureza Química dos Tricotecenos

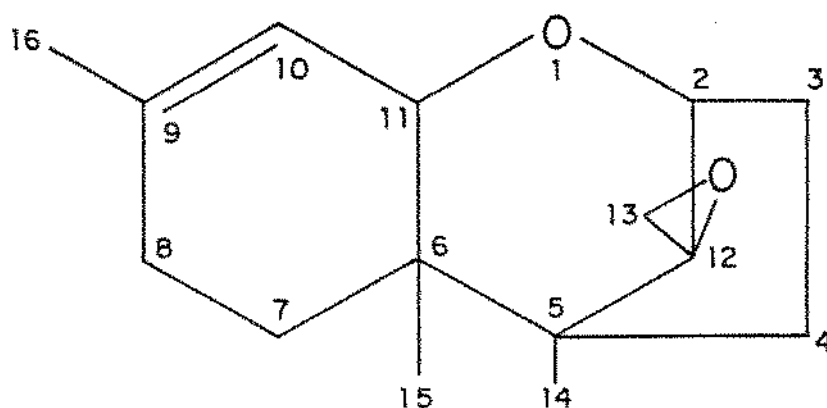


Figura 1: Estrutura e Sistema de numeração dos tricotecenos.

Os tricotecenos são anéis tricotecanos que apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento epóxico nas posições doze e treze da estrutura (Figura 1). Substituintes, tais como, hidrogênios, hidroxilas, acilas, epóxidos ou ésteres podem estar presentes nos carbonos 3, 4, 7, 8, 14 e 15 (Snyder, 1986; Ueno, 1986; Eppley, 1979).

Considerando estes substituintes, existe uma classificação dos tricotecenos em quatro grupos: A, B, C e D. No grupo A estão os tricotecenos cuja posição 8 tem como substituintes grupos acilados ou hidroxilas, como a toxina T2 e o diacetoxiscirpenol. O grupo B é constituído por compostos onde na posição 8 está um grupamento cetônico, assim como o nivalenol e o deoxinivalenol. Os tricotecenos do tipo C possuem dois grupamentos epóxidos, como a crotocina. Tricotecenos macrocíclicos constituem o grupo D, onde

estão a roridina, a verrucarina e a satratoxina (Ueno, 1986; Snyder, 1986). Mais recentemente vem sendo acrescentado um quinto grupo a esta classificação, constituído por compostos tricotecanos que não possuem epóxido na estrutura (Ueno, 1986).

Uma outra classificação considera a presença ou não de anéis macrocíclicos ligados ao carbono 4 e carbono 5, nomeando-os tricotecenos macrocíclicos e não macrocíclicos (Ueno, 1983; Snyder, 1986).

Os tricotecenos não macrocíclicos, que ocorrem na natureza, possuem peso molecular entre 250 e 350, aparecem como cristais incolores, são opticamente ativos e solúveis em solventes orgânicos de polaridade média e alta como o clorofórmio, acetona, álcoois e acetato de etila (Ueno, 1986, 1983; Snyder, 1986; Cole & Cox, 1981).

O anel epóxido da posição 12, 13 é bastante estável, mas condições para sua abertura vem sendo estudadas, uma vez que sua integridade é a principal responsável pelos efeitos tóxicos destas toxinas (Snyder, 1986; Ueno, 1977, 1986). A abertura do anel epóxido tem lugar em meio fortemente ácido, dando origem a um rearranjo intramolecular na estrutura. Condições drásticas como presença de hidretos de alumínio e lítio (LiAlH_4) ou peróxidos, ou ainda hidratação em autoclave, podem ocasionar abertura do anel e rearranjo na estrutura. Uma enzima, a epóxido hidrase, também é capaz de produzir glicóis a partir do epóxido, após a abertura do anel (Ueno, 1983; Grove et alii, 1984).

Os átomos de carbono ligados a grupos hidroxila, acetil ou cetona podem sofrer reações químicas características. Tais reações são realizadas em tricotecenos com objetivo de estudar a sua estrutura química, confirmar sua presença em amostras de alimentos e rações e verificar as alterações que possam ocorrer em sistemas biológicos (Ueno, 1983; Stahr, 1983; Grove, 1984; Snyder, 1986; Marochi, 1988).

Para os grupamentos hidroxilas as reações mais comuns de serem utilizadas para deriva-los são: acetilação, alquilação, fluoroacetilação, fluoroalquilação e sililação. As oxidações são menos empregadas devido as condições drásticas necessárias.

As posições esterificadas com acetil ou radicais cíclicos podem ser hidrolisadas em meio alcalino resultando nos respectivos álcoois (Bata et alii, 1984; Rood et alii, 1988a,b).

Os tricotecenos do grupo B, que possuem função cetônica no carbono 8, podem ser reduzidos aos álcoois correspondentes, sob condições moderadas, tanto de temperatura como de potencial de óxido-redução do reagente.

Sabe-se que durante o metabolismo secundário dos fungos produtores de tricoteceno podem ocorrer reações de hidrólise e/ou acetilação catalisadas enzimaticamente com interconversão dos metabólitos produzidos (Ueno, 1983; Savard, 1991).

2.1.2 - Efeitos Tóxicos

Sintomas característicos dos efeitos tóxicos agudos dos tricotecenos em humanos são vomitos, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, angina necrótica, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragia generalizada, seguidos ou não por morte. Os mesmos sintomas podem ser observados em animais intoxicados (Scott, 1984; Snyder, 1986; Ueno, 1986).

Embora surtos em animais, ocasionados por toxinas de Fusarium e Stachybotrys, sejam conhecidos desde o século XVIII, o papel dos tricotecenos como agentes etiológicos destas doenças só foi caracterizado por Bramburg e Hsu e seus colaboradores no final da década de sessenta (Ueno, 1983). Na ocasião, foi demonstrado que a presença da toxina T2 em rações era a responsável pela morte de vacas leiteiras que consumiam este alimento contaminado (Hsu et alii, 1972).

O surto clássico de fusariotoxicose em humanos, que registrou casos fatais, ocorreu após a segunda guerra mundial. A população atingida consumiu alimentos produzidos a partir de grãos

que não puderam ser colhidos durante o inverno. Os sintomas da doença, denominada Aleuxia Tóxica Alimentar, foram febre, angina necrótica, leucopenia, destruição da medula óssea seguidos de mortes. Posteriormente atribuiu-se estes sintomas à presença de tricotecenos, pois eram semelhantes aos encontrados em estudos toxicológicos com estas micotoxinas (Osborne, 1982; Ueno, 1983; Snyder, 1986).

Os trabalhos de Ueno (1986) e Marochi (1988) apresentam tabelas onde são apresentados outros casos clássicos de toxicoses. Pode-se verificar que os sintomas decorrentes da intoxicação por tricotecenos que foram verificados em animais e humanos, tanto antes do desenvolvimento dos métodos analíticos adequados, como após, já eram associados a contaminação fúngica de alimentos.

Mais recentemente, Bhat e colaboradores (1989) verificaram um surto de fusariotoxicose no vale de Kashmir na Índia. Os distúrbios foram observados na população após a ingestão de pão de trigo contaminado com fungos dos gêneros Aspergillus e Fusarium. As micotoxinas detectadas neste trigo foram deoxinivalenol (0,1 - 0,43 mg/Kg), nivalenol (0,03 - 0,1 mg/kg), toxina T2 (0,55 - 0,8 mg/kg) e acetildeoxinivalenol (0,6 - 2,4 mg/kg).

Casos de micotoxicoses associadas a toxinas de Fusarium vem igualmente sendo relatados em suínos na Argentina (Marpegan, 1988), e em humanos na China e África do Sul. Os últimos associados a uma alta incidência de carcinomas no esôfago (Xia et alii, 1989; Luo et alii, 1990; Sydenham et alii, 1990).

Os efeitos mais estudados dos tricotecenos são os dérmicos, eméticos e no sistema sanguíneo. Grandoni e colaboradores (1990), demonstraram que no sistema sanguíneo, as plaquetas também tem sua função inibida na presença de tricotecenos, como toxina T2, diacetoxiscirpenol e HT2. Esta atividade parece apresentar uma correlação positiva com o caráter lipofílico da toxina. Em culturas, as células renais de fetos bovinos também se mostraram susceptíveis aos efeitos tóxicos da toxina T2 (Yoneyama & Sharma, 1989).

O fato destas micotoxinas atingirem diversos órgãos tem chamado a atenção dos pesquisadores. Numerosos experimentos com animais de laboratório tem sido realizados, visando reproduzir os sintomas ocasionados pela ingestão natural, assim como compreender o modo de ação dos tricotecenos. A diversidade de sintomas observados indica que os tricotecenos atuam nas etapas de transcrição e translação do RNA. Conseqüentemente ocorre inibição da síntese de proteínas e portanto descontrole na atividade metabólica e sua regulação (Kiesling, 1986; Shepherd & Gilbert, 1986; Snyder, 1986; Ueno, 1986).

A inibição da síntese proteica ocorre pela ligação do grupo epóxido do tricoteceno com grupamento SH dos aminoácidos que compõe a peptidil transferase, mas outras enzimas do processo podem ser alteradas por este mesmo mecanismo. As células de função imunológicas parecem ser mais sensíveis a este efeito que as demais células dos organismos (Ueno, 1977, Shepherd & Gilbert, 1986; Snyder, 1986; Ueno, 1986).

A toxicidade dos tricotecenos depende da presença do anel epóxido nos carbonos 12,13 e da dupla ligação nos carbonos 9-10. Cada tricoteceno, em particular, também tem sua atividade determinada pelo número e posição de hidroxilas e ésteres nas demais posições. Exemplificando, um tricoteceno com um pequeno substituinte no carbono 4 pode atuar como inibidor na fase terminal da síntese proteica. Um ester na posição 4 pode tornar o composto capaz de inibir a elongação da cadeia de proteína (Kiesling, 1986; Ueno, 1986).

Os tricotecenos macrocíclicos são os mais potentes e são os que comumente ocasionam intoxicações agudas. A toxicidade dos tricotecenos não macrocíclicos varia entre o deoxinivalenol e a toxina T2 que é a mais tóxica para a maioria dos animais experimentados. Níveis na faixa de 0,05 a 10 ug por kilo de peso corpóreo dos diferentes tricotecenos são necessários para serem observados efeitos dérmicos. Efeitos eméticos são observados quando doses de 0.1 a 13,5 mg/Kg de peso corpóreo são administradas. As doses letais variam em torno de 1 e 700 mg/Kg de peso de peso corpóreo (Shepherd & Gilbert, 1986; Snyder, 1986; Ueno, 1986).

Os tricotecenos durante seu metabolismo podem sofrer reações de hidrólise, hidroxilação, abertura do anel epóxido e conjugação, resultando em compostos de toxicidades pouco conhecidas. A importância de cada reação varia para cada espécie animal, justificando as diferentes manifestações observadas quando da ingestão das toxinas (Ueno, 1983, 1986).

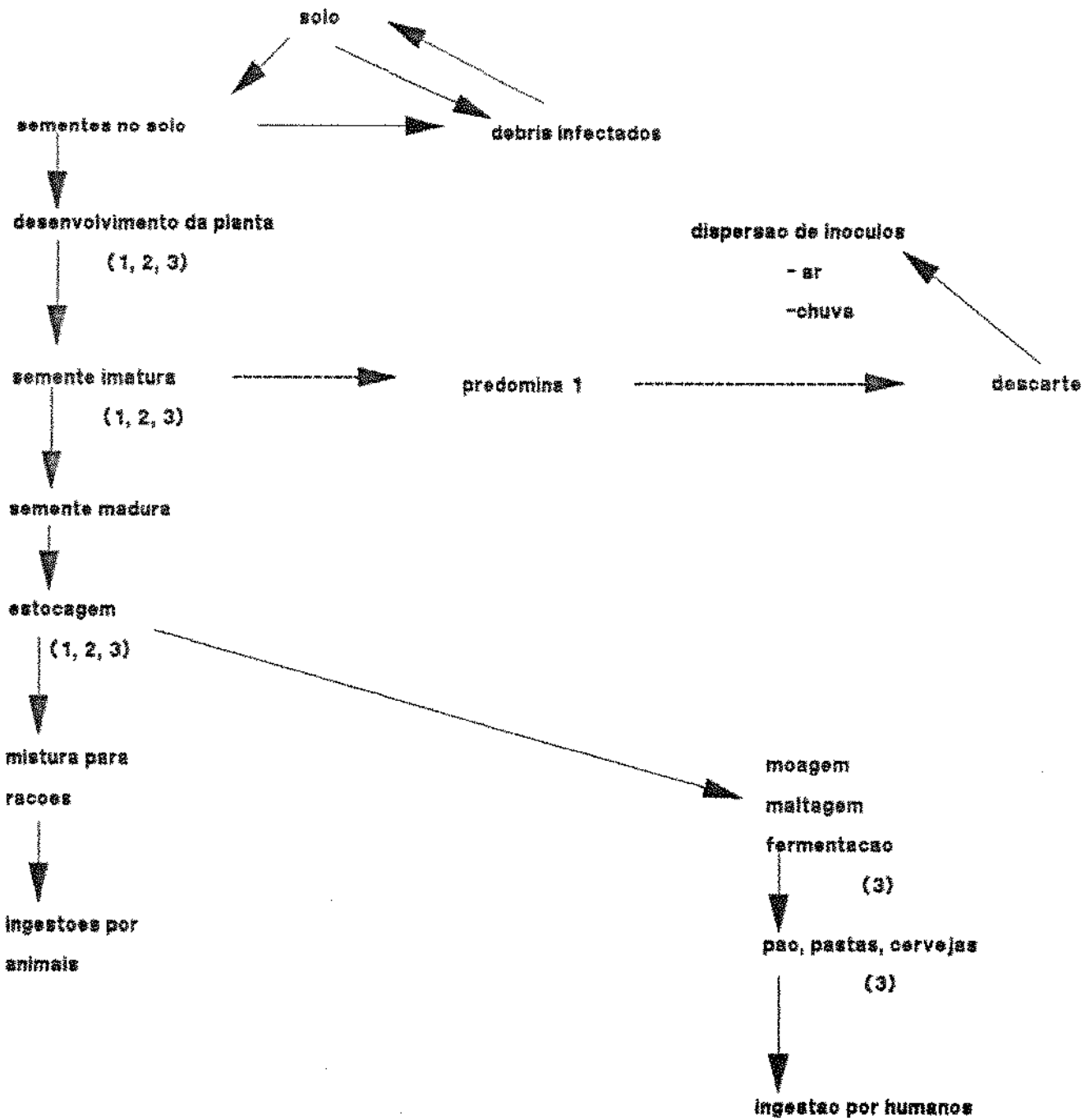
O único tricoteceno que demonstrou atividade teratogênica foi a toxina T2, em camundongos. Um aspecto da carcinogenicidade foi observado em estudos epidemiológicos relacionando a presença de tricotecenos em dietas e o aparecimento de câncer de esôfago em populações de China e da África do Sul (Xia et alii, 1989; Sydenham et alii, 1990).

Os efeitos fitotóxicos de tricotecenos vem sendo observados em cereais que tiveram sua atividade mitótica alterada pela ação de diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol e fusarenona X (Casale & Hart, 1986; Packa, 1991).

As características de maltagem da cevada, bem como o crescimento e atividade de leveduras durante o processo fermentativo de bebidas também são influenciadas pela presença de diacetoxiscirpenol e deoxinivalenol nos grãos utilizados. Constatou-se que o efeito do deoxinivalenol é menos acentuado que do diacetoxiscirpenol (Schapira et alii, 1989; Whitehead & Flannigan, 1989).

2.1.3 - Fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico e a produção de tricotecenos.

As situações em que ocorre crescimento dos fungos e produção de micotoxinas estão resumidas na Figura 2. Pode-se observar que os estágios de maturação, assim como o armazenamento de sementes são os mais propícios para a invasão e produção de micotoxinas por fungos. As micotoxinas podem ter seus níveis diminuídos apenas durante o desenvolvimento da planta, por abortamento das partes com maior grau de contaminação, e durante o processamento, pela separação das diferentes partes das sementes ou por outros processos físicos e químicos.



- 1-crescimento de fungo
- 2-produção de micotoxinas
- 3-decomposição de micotoxinas

Figura 2 - Etapas de cultivo e utilização de cereais que podem envolver produção e destruição de micotoxinas (segundo Mills, 1989).

As sementes destinadas ao consumo animal não são submetidas aos mesmos critérios de seleção que às destinadas ao consumo humano. Este fato aliado ao menor número de etapas de processamento, justificam, em parte, o maior número de relatos de micotoxicoses em animais.

No processo de contaminação de sementes por fungos, no campo ou durante o armazenamento, são fatores críticos a disponibilidade de água e a temperatura. O nível ideal para cada espécie e linhagem de fungo, é uma característica individual (Mills & Wallace, 1979; Abramson et alii, 1990).

Por exemplo, as espécies de Fusarium são comumente encontradas no solo, na superfície das plantas e, conseqüentemente após a colheita podem permanecer nos grãos, durante o armazenamento, ao contrário de Aspergillus sp e Penicillium sp que são considerados exclusivos do armazenamento.

Christensen e Kaufmann (1965), classificaram os fungos contaminantes de grãos segundo suas necessidades de água em "fungos de campo" e "fungos de armazenamento", necessitando para seu estabelecimento de umidades acima de 20% e entre 13-18% respectivamente. Entretanto, ainda que o gênero Fusarium seja considerado "fungo de campo", espécies do gênero são constantemente isoladas de milho armazenado (McLean e Berjak, 1987).

Fatores como: pH do solo, composição de gases na atmosfera, interação com bactérias, outros fungos e artrópodes, agrotóxicos, irradiação, danos físicos e práticas agrícolas também podem influenciar o desenvolvimento de fungos em sementes (Kissman, 1977; Teich & Hamilton, 1985; Blaney et alii, 1986; Reis, 1986; Lacey, 1988; Wood & Carter, 1989; Abramson et alii, 1990). As características da variedade influenciam na sensibilidade à infecção por fungos, como por exemplo a altura do vegetal que apresenta correlação negativa com a susceptibilidade à infecção (Schroeder & Christensen, 1963; Kissman, 1977; Couture, 1982; Linhares et alii, 1986; Abramson et alii, 1987; Annone & Frutos, 1988; Teich, 1989).

No caso específico de produção de tricotecenos e zearalenona, os fungos dos gêneros Fusarium, Stachybotrys, Myrothecium e Tricothecium são os principais contaminantes de sementes. Entretanto, as espécies do gênero Fusarium são predominantes, principalmente quando se trata de tricotecenos dos grupos A e B (Kurata, 1977; Ueno, 1986).

Vem sendo verificada uma correlação positiva entre a presença de Fusarium equiseti, Fusarium culmorum, Fusarium sambicium, Fusarium oxysporum, Fusarium poae e outras espécies de Fusarium e de tricotecenos como deoxinivalenol, nivalenol, acetildeoxinivalenol e fusarenona X (Szathmary et alii, 1976; Abbas et alii, 1989; Bosch et alii, 1989; Botallico et alii, 1989; Perkowsky et alii, 1990).

Algumas espécies de Fusarium produzem vários tricotecenos simultaneamente, como é o caso de Fusarium tricinctum e Fusarium graminearum que podem produzir diacetoxiscirpenol, toxinas HT2 e T2, nivalenol e deoxinivalenol. Outras produzem apenas um tipo de toxina, como é o caso de linhagens de espécie de Fusarium nivale que só produzem o nivalenol. Os demais gêneros citados acima são geralmente produtores de tricotecenos macrocíclicos. Cepas de Myrotherium spp e Trichothecium roseum e viride podem produzir tricotecin, diacetilverrucarol, tricoteceno e tricoteceno 4,8 diol, provavelmente numa etapa prévia à produção de estruturas macrocíclicas (Ueno, 1983, 1986; Scott, 1984; Snyder, 1986; Perkowski et alii, 1991).

Os fungos do gênero Fusarium estão amplamente distribuídos na natureza podendo contaminar várias partes dos cereais, desde as raízes até as sementes (Metha, 1978; Valarini et alii, 1981; Barros, 1985, 1988; Chelkowsky et alii, 1987). As temperaturas ótimas para infecção pelas diferentes espécies do gênero variam entre 0 e 35°C, e as umidades relativas ótimas estão entre 60 e 90% (Ueno, 1983; Lacey, 1988; Mills, 1989). Geralmente Fusarium infecta os cereais durante a inflorescência e formação de sementes (Schroeder & Christensen, 1963; Metha, 1978; Couture, 1982).

Condições para cultivo e produção "in vitro" de micotoxinas por várias espécies de Fusarium isoladas de grãos contaminados e do solo vem sendo estudadas por diferentes autores (Naik et alii 1978; Miller & Greenhalgh, 1985). Estes estudos demonstram que existe diferença entre a capacidade produtiva das diferentes espécies e cepas e que estas estão relacionadas com as condições geográficas e/ou climáticas de onde foi isolado o microorganismo (Neish & Cohen, 1981; Sinha et alii, 1986; Evidente et alii, 1989; Mills, 1989; Faifer et alii, 1990).

As condições naturais para a produção de micotoxinas são difíceis de serem estudadas por estarem influenciadas por fatores correlacionados entre si de maneira complexa (Sinha, 1977; Sinha et alii, 1986; Abramson et alii, 1990).

A correlação entre o teor de micotoxinas e a população fúngica presente e o grau de contaminação nem sempre é positiva. As sementes frescas já contaminadas podem ter seus valores de micotoxinas aumentados ou diminuídos, dependendo da disponibilidade de água, temperatura, interação com outros microorganismos ou outros fatores (Farnworth & Neish, 1980; Miller & Young, 1983; Shotwell et alii, 1985; Lacey, 1988; Perkowski et alii, 1991; Savard, 1991).

2.1.4 - Ocorrência no âmbito internacional

Em 1978, Ciegler, num artigo de revisão, afirmava que existiam poucos dados sobre a ocorrência de tricotecenos no mundo. Apesar disto, já era possível correlacionar a incidência destas micotoxinas com fatores climáticos, pois estas ocorriam preferencialmente em regiões onde períodos frios e úmidos eram registrados.

Naquela ocasião os países que haviam constatado a presença de tricotecenos em seus produtos agrícolas eram Japão, Coréia, Rússia e Estados Unidos (Ciegler, 1978). Nos anos seguintes, o número de países que relataram a incidência de 12, 13 e 14 tricotecenos dobrou, como pode ser verificado pelas revisões publicadas por Ueno (1983, 1986); Scott (1988); Tanaka e colaboradores (1988) e Jelinek e colaboradores (1989).

Os países mais preocupados com a contaminação de seus alimentos, por micotoxinas desta classe, são os Estados Unidos, Canadá, Japão e antiga União Soviética. No entanto, a constatação que os tricotecenos estão amplamente distribuídos pelo mundo vem preocupando países como a Itália, Inglaterra, Finlândia, Suécia, Argentina, Austrália, Nova Zelândia, Espanha, Índia, África do Sul, Polônia e Grécia que não estavam tradicionalmente envolvidos com este tipo de contaminação (Bottalico et alii, 1981, 1989; Gilbert et alii, 1983; Osborne & Willis, 1984; Tanaka et alii, 1985; Tseng et alii, 1985; Lee et alii, 1986; Olsen et alii, 1986; Sydenham et alii, 1986; Visconti et alii, 1986, 1990; Banchemo et alii, 1987; Marpegan 1988; Scott, 1988; Muñoz et alii, 1990; Ramakrishna et alii, 1990; Tutelyan et alii, 1990).

Os grãos de cereais, como trigo, milho, aveia, centeio, arroz e produtos derivados são os mais atingidos pela contaminação, porém Mirocha (1976) e Bhavanishankar e Shanta (1987) constataram a presença de tricotecenos em pasta de amendoim, sorgo, gergelim e soja (Richardson et alii, 1985; Ueno, 1986; Scott, 1988).

Em ordem decrescente os tricotecenos mais encontrados em cereais são o deoxinivalenol, nivalenol, fusarenona X, toxinas T2 e HT2 e diacetoxiscirpenol. Outras micotoxinas, como o T2 tetraol, T2 triol, acetoxinivalenol vem sendo detectadas na Ásia e Europa, porém com menor frequência (Scott, 1988).

A co-contaminação mais comumente relatada em presença de deoxinivalenol e nivalenol é a de zearalenona (Mirocha et alii, 1976; Marasas et alii, 1977; Tanaka, 1984, 1985; Abbas et alii, 1989; Hussein et alii, 1989 e Perkowski et alii, 1990). Outras combinações encontradas em grãos incluem a ocratoxina A, butenolide, moniliformina, fusarina, fusarenona X e outras (Thiel et alii, 1982; Shepherd & Gilbert, 1986; Golinski et alii, 1988; Scott, 1988; Abbas et alii, 1989; Tanaka et alii, 1990).

Os levantamentos demonstram que as linhagens toxigênicas variam no seu comportamento de região para região. Um exemplo interessante vem do Japão, onde foi observado que linhagens de

Fusarium graminearum quando isolados no norte do país produziam predominantemente deoxinivalenol. No entanto, nas isoladas no sul, nivalenol era o único tricoteceno encontrado (Scott, 1988). Yoshizawa e Hosokawa (1983) e Sugiura e colaboradores (1990), detectaram no Japão uma linhagem de Gibberella zeae que produz deoxinivalenol e nivalenol simultaneamente.

As espécies de Fusarium isoladas de grãos também foram encontradas, no solo, na Nova Zelândia e na Noruega. Quando cultivadas em arroz parboilizado produziram zearalenona, deoxinivalenol e acetil deoxinivalenol. Produziram também um fator citotóxico, menos conhecido, o HM-8 e a moniliformina (Abbas et alii, 1989; Bosch et alii, 1989).

Tanaka e colaboradores (1988) efetuaram um levantamento com 500 amostras de grãos de trigo, cevada, aveia, milho e outros, provenientes de 19 países. Os resultados mostraram que cerca de 48, 45 e 44% das amostras apresentavam níveis significantes nivalenol, deoxinivalenol e zearalenona, com teores médios de 0,27; 0,29 e 0,24 mg/kg, respectivamente.

Apesar da presença de tricotecenos em produtos alimentícios vir sendo constatada em muitas regiões do mundo, apenas alguns países, como Canadá, Estados Unidos e antiga União Soviética, possuem regulamentação que limita os níveis de tricotecenos deoxinivalenol e nivalenol em alimentos. Estes variam de 0,5 a 2 mg/Kg para produtos de consumo humano e vão até de 4 mg/Kg para rações animais (Van Egmond, 1989).

A Romênia estabelece os níveis mais rígidos, 0,005 mg/Kg de deoxinivalenol em rações; 0 mg/Kg para estaquibotriotoxinas também em rações e 0,030 mg/Kg para zearalenona em alimentos (Van Egmond, 1989).

Uma interessante observação pode ser encontrada num trabalho de Scott (1984), onde foi verificado um declínio no conteúdo de deoxinivalenol nos grãos de trigo de inverno durante o armazenamento a 4°C por um período de três a seis meses. Em contraste, outros trabalhos relatam que diferentes providências no sen-

tido de descontaminar os produtos agrícolas das toxinas de *Fusarium* tem tido pouco ou nenhum sucesso. Diversos tipos de processamento, tais como beneficiamento de cereais, também não são efetivos para eliminar o problema (Osborne, 1982; Scott, 1984; Sheperd & Gilbert, 1986; Ueno, 1986). Deoxinivalenol foi detectado por Scott e colaboradores (1988) em alimentos infantis do tipo cornflakes, farinha de milho, farelo e cereais mistos. Na Tabela 1 aparece o declínio dos níveis de tricotecenos decorrente de processos diversos.

Tabela 1: Destruição ou perda de tricotecenos durante diversos processamentos de trigo.

Micotoxina	Produto/ Processo	Destruição ou perdas (%)
Deoxinivalenol	espaguete	43-53 (Nowick et alii, 1988)
Deoxinivalenol	talharim japonês	32-59 (Scott, 1984 e Nowick, et alii, 1988)
Deoxinivalenol	talharim chinês	68-100 (Scott, 1984 e Nowick, et alii, 1988)
Deoxinivalenol	pão	0,0 (Scott et alii, 1984)
Deoxinivalenol	clarificação e moagem	5,5 (Scott et alii, 1984)
outros tricotecenos	pão	33-60 (Scott et alii, 1984)

2.1.5 - Ocorrência no Brasil

No Brasil, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium graminearum*, foram espécies predominantes em amostras de milho, trigo e arroz, procedentes de várias regiões.

Segundo Wentz e colaboradores (1983), 90% das amostras de rações e milho utilizadas na alimentação de suínos do Estado de Santa Catarina, estavam contaminadas por Fusarium sp, sendo que em alguns casos foi possível detectar zearalenona.

Asevedo (1988), analisando 90 amostras de grãos de milho provenientes de silos de várias regiões do Brasil, encontrou 62,2% das amostras contaminadas por Fusarium sp. Entretanto, os gêneros predominantes foram Aspergillus e Penicillium.

Em 1988, Lillehoj e Zuber analisaram sementes de milho, provenientes de várias partes do mundo, e observaram que 92% das amostras oriundas do Brasil, quando cultivadas em agar malte e incubadas a 25°C, estavam contaminadas por Fusarium sp. As menores frequências foram do gênero Aspergillus e as mais elevadas do gênero Fusarium foram registradas em amostras brasileiras.

Pozzi e outros, analisando 70 amostras de grãos de milho pós-colheita e armazenadas observaram uma microbiota fúngica constituida, predominantemente, por Fusarium sp (100%), seguida de Penicillium (45,7%) e Aspergillus (42,9%).

A Tabela 2 descreve os casos publicados no país, envolvendo a presença de Fusarium em sementes. Dois tipos de relato podem ser notados. Por um lado, o isolamento de fungos presentes em grãos ingeridos por animais domésticos acometidos com toxicoses e os sintomas patológicos desenvolvidos. Por outro lado, o exame de sanidade de sementes que é executado tanto para relacionar o estado destas com perdas observadas em safras agrícolas como para caracterizar seu aspecto com os tipos de fungos contaminantes.

No entanto, os únicos trabalhos em que análises químicas foram relatadas são os de Sabino et alii (1989) e Meirelles (1990).

Outras micotoxinas foram determinadas em grãos suspeitos de terem ocasionado toxicoses em animais domésticos. Porém, por falta de metodologia acessível, a única toxina de Fusarium normalmente determinada é a zearalenona. Um exemplo é o trabalho de Hirooka e colaboradores (1988), onde foram determinadas as seguintes toxinas: aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho que haviam ocasionado leucoencefalomalácia em eqüinos no estado do Paraná. O fungo predominante encontrado foi o Fusarium moniliforme e em duas amostras foi detectada zearalenona.

Na tentativa de solucionar o problema de falta de uma metodologia simples para determinação de tricotecenos no Brasil, Marochi (1988) desenvolveu um método para análise simultânea de toxina T2, diacetoxiscirpenol, roridina A e verrucarina A, usando cromatografia em camada delgada.

Sabino et alii (1989) determinaram deoxinivalenol em amostras de trigo e milho, empregando cromatografia em camada delgada. Das 120 amostras analisadas duas estavam contaminadas com 183 ug/Kg. Não foi realizada análise microbiológica.

Jarvis (segundo Ueno), pesquisando a capacidade de tricotecenos macrocíclicos na inibição de tumores, isolou um, denominado "bacharin", de um arbusto brasileiro, Baccharis megapota mica (Ueno, 1986). Este arbusto no sul do Brasil é conhecido como miu-miu e se ingerido pelo gado ocasiona a morte. Pesquisadores estrangeiros vem estudando este tricoteceno que é o único encontrado numa planta superior, decorrente da transformação de tricotecenos como a verrucarina e roridina originada de fungos como o Myrothecium verrucaria e M. roridium (Jarvis et alii, 1987; Mirocha, 1989). Chama atenção dos pesquisadores o fato do arbusto ao se desenvolver em outros solos que não o brasileiro não produzir os baccharinoides (Jarvis et alii, 1981).

Tabela 2 - Ocorrência de Fusarium no Brasil.

Problema	época	local	produtos	parâmetros avaliados	autores
epidemia generalizada "golpe branco"	1976	RS	trigo	danos nos grãos e perdas nas lavouras por contaminação com <u>F. graminearum</u>	Metha, 1978
perdas em safras por septoríose e giberela	1976	SP (Assis)	trigo	-dados pluviométricos -temperatura -variedade	Barros e Issa, 1977
Leucoencefalomalácia em equinos	1979 1980	RS (Zona Sul)	milho mofado	-aspectos climáticos -microbiota fúngica	Riet-Correa et alii, 1982
infecção de sementes e manchas foliares	1980 1981	SP (região Sul e Vale do Parana-panema)	trigo	-microbiota fúngica	Lasca et alii, 1983
doenças fúngicas	1980 1981	SP	trigo	-avaliação de lavouras -grau de intensidade das doenças	Barros, et alii, 1982
<u>Gibberella zeae</u>	1981 1982 1983	RS	trigo	-no. de grãos/espigas -X e grãos giberelados -condições climáticas	Linhares et alii, 1986
Leucoencefalomalácia em equinos	inverno 1983	RS (zona Sul)	milho mofado	-aspectos climáticos -fungos	Barros et alii, 1984
perdas em safras por giberela	1984 1985	RS	trigo	-proposta de critérios para avaliar perdas	Reis, 1986
Leucoencefalomalácia em equinos	inverno 1988 1989	RS MG SC	milho mofado	-fungos -aspectos clínicos patológicos -moniliformina, zearalenona, deoxinivalenol e dia-cetoxiscirpenol	Meirelles, et alii, 1990
Leucoencefalomalácia em equinos	inverno 1988 1989	RS (zona Sul)	milho	-umidade dos grãos -gêneros de fungos	Mendes, et alii, 1989

2.2 - Metodologia Analítica para Determinação de Tricotecenos

Para determinação analítica de tricotecenos alguns aspectos devem ser considerados: 1) a grande faixa de polaridade dos componentes do grupo dificulta a extração da matriz. Os solventes utilizados arrastam também uma série de compostos interferentes, tornando necessário uma elaborada etapa de limpeza (Trenholm et alii, 1985; Shepherd & Gilbert, 1986; Snyder, 1986); 2) a ocorrência simultânea de diferentes tricotecenos e os seus vários níveis de toxicidade tornando desejável quantificá-los separadamente, o que vem a apontar os métodos cromatográficos como os mais indicados; 3) a falta de absorbância no ultra-violeta ou visível e de fluorescência, dos tricotecenos do grupo A e B, cria a necessidade de uma derivação que possibilite determiná-los por cromatografia em camada delgada ou líquida de alta eficiência. Por cromatografia gasosa a derivação vem a ser aconselhável para que haja uma melhoria nas propriedades cromatográficas (Eppley, 1975; Ciegler, 1978; Scott, 1982; Romer, 1984; Snyder, 1986; Betina, 1989).

Nos anos setenta, numerosos procedimentos foram propostos para detecção e análise de tricotecenos. Na década seguinte, com o aumento da sofisticação dos instrumentos analíticos este número continuou progredindo. Devido a possibilidade de produção simultânea de mais de um tipo de tricoteceno, tem sido recomendado o desenvolvimento de métodos capazes de detectar vários compostos desta família simultaneamente. Estudos colaborativos para selecionar métodos de triagem e de confirmação também são recomendados (Scott 1988, 1990, 1991, 1992).

Os métodos para detecção e quantificação de tricotecenos podem ser divididos em biológicos e físico químicos. Os biológicos são altamente sensíveis mas pouco específicos e os físico-químicos muito específicos mas nem sempre muito sensíveis (Eppley, 1975). Esta situação vem sendo superada pela evolução da instrumentação analítica e pelo surgimento de métodos de imunoensaio, estes de maneira característica durante o ano de 1990 (Chu, 1984; Snyder, 1986; Scott, 1991).

2.2.1 - Métodos Cromatográficos

2.2.1.1 - Cromatografia em papel

As técnicas envolvendo cromatografia em papel para determinação de micotoxinas foram muito utilizadas nas décadas de cinquenta e sessenta, quando foram isolados metabolitos de fungos devido ao interesse despertado pelas suas possíveis propriedades como antibióticos.

A primeira distinção entre os metabólitos fúngicos empregou como critério a separação baseada em "salting out". Outras classificações envolvendo cromatografia em papel e diferentes critérios de separação existiram, mas apresentam apenas valor histórico pois foram superadas pela cromatografia em camada delgada devido a sua versatilidade em termos de fases estacionárias e sensibilidade (Betina, 1989).

2.2.1.2 - Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada, por sua simplicidade e baixo custo, foi muito utilizada para análise qualitativa e quantitativa, tanto para um único tricoteceno como para vários simultaneamente (Takeda et alii, 1979; Takitani & Asabe, 1983, 1986; Eppley, 1984; Romer, 1984; Tapia, 1985; Thrane, 1986; Betina, 1989).

As muitas variações possíveis, relatadas na literatura estão resumidas no trabalho de Marochi (1988). Os solventes mais utilizados para extração são misturas de metanol:água ou acetonitrila:água. Estes são utilizados por arrastarem menor número de interferentes como lipídios, pigmentos, etc (Romer 1978; Marochi, 1988).

Na etapa de clarificação são usados agentes precipitantes para proteínas e outras macromoléculas. Os clarificantes mais utilizados para determinação de tricotecenos são: sulfato de amônio, acetato de chumbo, sulfato de cobre, gel férrico e outros. Marochi (1988), estudando o efeito de vários precipitantes na

limpeza de extratos, para cromatografá-los em camada delgada, obteve bons resultados empregando gel férrico e carbonato básico de cobre.

Alguns tipos de amostras necessitam de etapas adicionais de limpeza além da clarificação e da partição, sendo as minicolunas com adsorvente o recurso mais utilizado. Como adsorventes são utilizados: sílica gel, florisil, Celite e outros. As mini-colunas que misturam de carvão-ativo, Celite e alumina tem sido empregadas para limpeza de amostras complexas com resultados satisfatórios (Romer, 1978; Trucksess, 1984; Marochi, 1988).

Com relação a etapa de desenvolvimento em camada delgada a fase estacionária mais empregada é a sílica gel com espessura de 0,25 mm para triagem e quantificação (Marochi, 1988).

A detecção de tricotecenos não fluorescentes requer o uso de derivação. São de uso corrente o ácido sulfúrico, o para-anisaldeído, cloreto de alumínio, p-nitrobenzilpiridina, nicotinamida, 2-acetilpiridina e outros. O ácido sulfúrico é um reagente que se presta bem para a revelação de tricotecenos do grupo A e B. Os tricotecenos do grupo B em sua presença desenvolvem uma coloração marrom e os do grupo A, uma fluorescência azul (Eppley, 1979; Ueno, 1983; Snyder, 1986; Marochi, 1988). Após a formação do cromóforo, a quantificação pode ter lugar por comparação visual com os padrões ou densitométrica, sendo a última aceita como a mais sensível.

Os limites de detecção para tricotecenos do grupo A, quando revelados com ácido sulfúrico e aquecimento estão entre 50 e 100 ng. Para os tricotecenos do grupo B os limites estão entre 20 e 50 ng (Nesheim & Trucksess, 1986; Marocchi, 1988).

A cromatografia gasosa, por seus baixos limites de detecção, vem substituindo a cromatografia de camada delgada para tricotecenos. Pois os métodos que empregam cromatografia gasosa para determinação de tricotecenos são no mínimo dez vezes mais sensíveis que os que empregam camada delgada (Romer, 1984; Marochi, 1988).

2.2.1.3 - Cromatografia Gasosa

Entre as micotoxinas, os tricotecenos, principalmente os dos grupos A e B, são os mais frequentemente determinados por cromatografia gasosa. Não apresentam fluorescência e nem absorção no ultravioleta ou visível, no entanto, possuem grupamentos que se prestam a derivação (Romer, 1984; Snyder, 1986; Scott, 1988; Betina, 1989).

Como qualquer outra técnica cromatográfica, antes da determinação propriamente dita, são necessárias etapas de extração e limpeza. Os solventes empregados na fase de extração são de caráter polar, como o metanol e acetonitrila em misturas com água. A clarificação é feita por adição de agentes precipitantes, sendo o sulfato de amônio dos mais empregados. Amostras gordurosas requerem etapas de desengorduramento. O emprego de minicolunas é comum e os adsorventes geralmente utilizados são sílica gel, florissil, carvão ativo, Celite e alumina, individualmente ou em misturas (Romer, 1984; Trenholm et alii, 1985; Marochi, 1988).

Três tipos de detectores tem sido utilizados: de ionização em chama, de captura de elétrons e de massas. Scott (1982), resume os resultados de determinações de tricotecenos empregando detector por ionização em chama. Os níveis de recuperação e limites de detecção variam com o tipo de amostra e tipo de tricoteceno, quando são analisados os derivados de trimetilsilil. O deoxinivalenol e o nivalenol tem seu limites de detecção em torno de 100 ng/g. O diacetoxiscirpenol varia de 0,1 a 0,25 mg/kg e toxina T2 de 0,030 a 1 mg/kg (Porcher et alii, 1987).

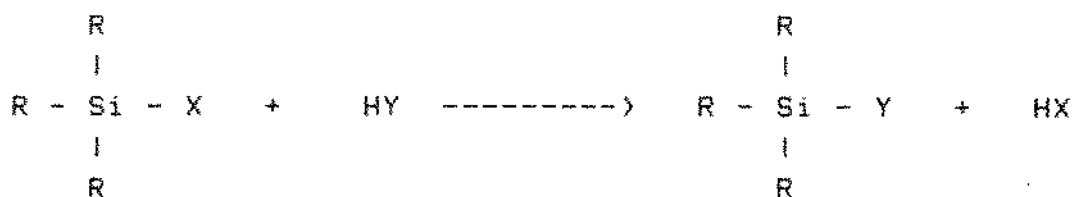
Os detectores por captura de elétrons são bastante sensíveis e seletivos, como se pode verificar pelos limites de detecção mais baixos, faixas de recuperação mais homogêneas e pela maior repetibilidade (Scott, 1982; Romer, 1984).

Os detectores de massas são os mais sensíveis e universais, mas são menos utilizados devido ao alto custo do equipamento. São mais comumente empregados apenas para confirmação de resultados (Rosen & Rosen, 1982; Romer, 1984; Betina, 1989; Scott, 1991).

Um ponto crítico na determinação de tricotecenos vem a ser a derivacão, efetuada previamente ao processo cromatográfico. Seu emprego advem da necessidade em: 1) reduzir a polaridade de grupamentos que livres podem apresentar adsorção inespecífica na fase estacionária. Esta se caracteriza no cromatograma por picos assimétricos e/ou "fantasmas"; 2) melhorar as propriedades cromatográficas dos compostos, aumentando sua pressão de vapor; 3) possibilitar a separação de substâncias muito semelhantes entre si no seu estado natural; 4) introduzir grupos que tornam o composto adequado para o sistema de detecção empregado (Romer, 1984; Snyder, 1986).

Para tricotecenos são utilizadas derivacões do tipo: silanizacão, fluoroacetilacão e fluoroalquilacão (Scott, 1982; Romer, 1984; Gilbert et alii, 1985; Kientz & Verweij, 1986; Rizzo et alii, 1986; Snyder, 1986; Ueno, 1986; Wereford & Shaw, 1987).

A silanizacão substitui o hidrogênio de certos grupos funcionais, por radicais do tipo dimetilsilil [$\text{SiH}(\text{CH}_3)_2$], trimetilsilil [$\text{Si}(\text{CH}_3)_3$] e butirilsilil [$(\text{CH}_3)_2\text{SiCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$]. O mecanismo esquemático da reacão é seguinte:



Os grupos funcionais atingidos por esta reacão podem ser: hidroxilas em álcoois mono e/ou polihidroxilados, hidroxilas em ácidos e/ou fenóis e NH_2 em aminas, amidas e/ou aminoácidos.

A desvantagem, quando se usa derivados sililados e detector por ionizacão em chama para quantificá-los é a deposicão de sílica. No detector por captura de elétrons a sensibilidade é reduzida pela falta de halogênios na estrutura do derivado e depósitos de sílica também ocorrem (Romer, 1984; Scott, 1982).

A fluoroacetilacão introduz na molécula grupos do tipo trifluorometilacil, pentafluoropropilacil e heptafluorobutirilacil. Os grupos funcionais que participam da reacão de fluoracetilacão são aminas, álcoois e fenóis, como no processo anterior.

Na fluoroalquilação podem ser usados reagentes do tipo trifluorometil, pentafluoropropil e heptafluorobutil. Também aqui os grupos receptores são amínicos, alcoólicos e fenólicos.

Outro sistema de derivação é a acetilação com anidrido acético em meio a piridina, cujos limites de detecção não são mencionados na literatura (Martin & Stahr, 1986).

Os critérios para a escolha de um derivado são facilidade de emprego, que a derivação seja completa, volatilidade do derivado, sensibilidade do detector ao derivado e grau de melhoria das qualidades cromatográficas. Muitos autores, levando em consideração estes fatores, estabeleceram condições de derivação específicas para cada tipo de situação (Mirocha, 1979; Scott, 1982; Gilbert, 1985; Kientz & Verweij, 1986; Krishnamurthy & Sarver, 1986; Rizzo et alii, 1986; Wereford & Shaw, 1987).

Dentre os reagentes alquilantes, o heptafluorobutirilimidazol (HFBI) é o mais utilizado porém apresenta as seguintes desvantagens: a) precisa ser removido após a reação de derivação para que não ocorram interferências no cromatograma que possam dificultar a interpretação; b) quando é usada espectrometria de massas o peso molecular dos derivados heptafluorobutilados pode exceder a faixa de capacidade de massa do detector.

Para uso de espectrometria de massas, outros agentes fluorados são preferidos para a derivação, como o trifluoropropionil, trifluoroacetil e pentafluoropropionil (Kientz & Verweij, 1986; Krishnamurthy & Sarver, 1986; Wereford & Shaw, 1987).

O tipo de coluna que efetua a separação no cromatógrafo é outro fator determinante na qualidade dos resultados obtidos para as micotoxinas em estudo. O aparecimento das colunas capilares tornou possível a detecção e separação de compostos muito semelhantes e que aparecem como traços nos alimentos. As fases estacionárias utilizadas em colunas capilares para a separação de tricotecenos são as comumente empregadas para determinação de outros compostos: metil silicone; 5% fenilmetil silicone; 7% cianopropilfenil metil silicone; 50% fenilmetil silicone; 50% trifluoropropil metil silicone e 25% cianopropilfenil metil silicone.

São poucos os trabalhos onde são comparadas as separações obtidas por diferentes tipos de coluna (Szathmary et alii, 1980; Bata et alii, 1983). Considerando a importância deste fator, Scott & Kanhere (1986) compararam os diversos tipos de fases estacionárias para cinco tricotecenos do grupo B: deoxinivalenol, nivalenol, 3 acetildeoxinivalenol (3-ADON), 15 acetildeoxinivalenol (15 ADON), fusarenona X (FX); cinco do tipo A: toxina T2, HT2, diacetoxiscirpenol, neosolanol e 4 monoacetoxiscirpenol (MAS). Todos como derivados trimetilsililados e heptafluorobutilados em cinco fases estacionárias, com diferentes polaridades.

Para os derivados heptafluorobutilados a ordem de eluição não variou com a polaridade das colunas, já para os derivados trimetilsililados a variação na ordem de eluição foi mais influenciada pela polaridade. A separação dos tricotecenos do tipo A e B silanizados é também grandemente influenciada pela polaridade da coluna (Scott & Kanhere, 1986).

A detecção de tricotecenos por cromatografia gasosa vem sendo empregada para amostras de grãos cereais, como milho, trigo, aveia, arroz, centeio, cevada e seus derivados, misturas destes cereais em rações e outros tipos de grãos como soja e amendoim (Scott, 1988; Tanaka 1989). Também são relatadas determinações de tricotecenos e seus metabolitos, por este método, em plasma, urina e fezes de suínos, bovinos e cachorros (Rood, 1986; Betina 1989).

Swanson (1986) determinou deoxinivalenol e seu metabolito DOM-1 em amostras de leite. Para extração foi empregado acetato de etila, partição em acetonitrila e limpeza com cartuchos de C18. Foram analisados derivados de trimetilsilil e de heptafluorobutilil separados numa coluna de OV-17 e detectados por captura de elétrons.

Rajakyla e colaboradores (1987) e D'Agostino (1986) descreveram determinações de tricotecenos em sangue humano usando cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons e de massas respectivamente.

A biotransformação de tricotecenos vem sendo estudada com cromatografia gasosa e detector por captura de elétrons, tendo como amostras fígados de rato (Yoshizawa, 1980; Knupp et alii, 1986).

A Tabela 3 ilustra os diferentes tipos de extração, limpeza e condições cromatográficas para determinações de tricotecenos por cromatografia gasosa utilizadas no final dos anos setenta e durante a década de oitenta, conforme dados disponíveis na literatura.

2.2.1.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência não é muito utilizada para determinação de tricotecenos porque a sensibilidade é inferior a obtida por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons ou de massas. Isto porque os tricotecenos não apresentam fluorescência e a maioria não apresenta absorvância específica no ultravioleta ou visível, tornando necessário emprego de derivações ou outros recursos (Scott, 1982; Snyder, 1986; Betina, 1989; Childress et alii, 1990).

Para minimizar este problema Kato et alii (1979), propuseram um sistema de derivação baseado na propriedade dos tricotecenos de reagirem em meio ácido liberando formaldeído. Este último desenvolve cor em presença de ácido cromogênico ou fluorogênico (Betina, 1989). A aplicação deste sistema de detecção é de difícil emprego devido a viscosidade do ácido sulfúrico concentrado necessário para liberação do formaldeído.

Sano e seus colaboradores (Betina, 1989) separaram tricotecenos do tipo B (deoxinivalenol, nivalenol e fusarenona X), por cromatografia líquida de alta eficiência com um sistema de detecção baseado na liberação de formaldeído em meio alcalino. Este ao reagir com metilacetato e acetato de amônia dá origem a um composto fluorescente.

A detecção das toxinas HT2 e T2 e do diacetoxiscirpenol após a separação por CLAE e quantificação por refratometria é relatada por alguns autores (Schmidt et alii, 1981, 1984). Porém

Tabela 3 - Determinação de triazotecnos por cromatografia gasosa.

Toxicas	Extração/ Purificação	Derivação	Coluna/Detector	Limite de Detecção do Método	% Recuperação do Método	Amostra	Confirmação Quantificação	Autor
BOM, DAS, TE	acetato etila metanol/H ₂ O 40% gel férrico TLC	Tri-sil TNT	2X 04-1 0,90 m x 0,8 mm DCE	0,300 µg/kg DAS 0,070 µg/kg TE 0,050 µg/kg BOM	47%	Rações	Sim	Kirocha et al., 1976
TE, DAS	metanol/H ₂ O (OH) ₂ Si ₄ cloroformio coluna sílica gel	HFB	SE 30 (30%) 1,2 m x 2 mm DCE	0,1 µg/kg TE 0,025 µg/kg DAS	100% CV 17% TE 10% DAS	Milho e rações	Padrão interno metoxi-clor	Rumer et al., 1978
TE	acetato etila TLC	BSIFA	OV 17 (3%) 1 m x 2 mm DCE	0,003 µg/kg	85 a 200 µg/kg 65 a 20 µg/kg	Leite	Sim	Collins e Rose, 1977
DAS, TE, MEL Zea, BOM	acetato etila metanol desengordamentado	Tri-sil TBI	OV 101/OV 17 20 m x 0,25 mm DIC	150-10 µg/kg	—	Ração mista Milho	EM p/confirm- ação	Szathmari et al., 1980
Zea, TE, MEL HTZ	acetato etila TLC trisgel	BSAIFA	OV 101 10 m x 0,20 mm	50 µg/kg	80%	Cevada, trigo, aveia	HPTLC padronização externa	Tees et al., 1981
MTV, BOM, Fx DAS, MEL, TE HTZ, kutiaoi- lide, mosili- formina	metanol/H ₂ O colunas de Amberlite XAD-4 e Florisil CCD	TMBS/TCE	OV 17 (2%) 2 m x 3,2 mm DCE e DIC	0,1-0,2 µg/kg em DIC 0,002-0,03 µg/kg em DCE	85% (média)	Grãos, cereais e rações	—	Kamimura, et al., 1981
BOM	cloroformio etanol acetato etila coluna sílica gel Sephadex LH-20	HFB	SE 54 (30%) 30 m x 0,25 mm DCE	0,05 µg/kg	89,8% CV 4,0%	Grãos cereais	EM - Sim p/ confirmação	Cohen e Laposte, 1982
DAS, TE, BOM	metanol/H ₂ O acetato etila Sep-pal	hidrólise acetilação an. ac. piridina	OV 101 (10%) DIC DCE	1 µg/kg	—	Rações	EM	Stahr, 1982
BOM, DAS, TE, HTZ, FX, Zea	acetato etila metanol H ₂ O coluna sílica gel	BSIFA	SE 52 (30%) 12 m x 0,25 mm DCE	100 µg/kg	70-80% CV 10-10%	Trigo e milho	índice de Kovats	Bata et al., 1983

Toxinas	Extração/ Purificação	Derivação	Coluna/Detector	Limite de Detecção do Método	% Recuperação do Método	Amostra	Confirmação Quantificação	Autor
DOM	metanol/H ₂ O acetato etila coluna sílica gel	HFBT	OV 101 (3X) 1 m x 2 mm DCE	0,1 µg/kg	81,5X (média)	Trigo	padronização externa	Bennett et al., 1983
TE, HTE, DAS, DOM, Acetil TE	acetato etila metanol/H ₂ O coluna sílica gel	hidrólise alcalina BSTFA	SE 32 mm 10 m x 0,3 mm BIC	0,0001 µg	-----	Milho, aveia, cevada e rações	HPPLC e trans- esterificação w/ confirmação	Bata et al., 1984
DOM e Zea	metanol/H ₂ O acetato etila desenvolvimento coluna sílica gel	Tri-sil TBT	OV-1 (3X) 1,2 m x 2 mm BIC	0,02 µg/kg	58% arroz 100% milho 69% cevada 89% aveia	Milho, trigo, arroz, aveia, cevada	Zea - CCB nação	Bennett et al., 1984
DOM e HIV	acetomitrila n-hexano colunas de Florisil Sep-pal	TMS/TMS	OV 17 (15X) 3 m x 2,6 mm DCE	0,002 µg/kg	87%	Arroz, trigo e milho	EN - Sis	Yanaka, et al., 1985
Verrucarol, DAS, DOM, Ac. TE te- traol, TE HTE		anidrido acé- tico-piridina	OV 101 (3X) 2 m x 3 mm BIC	-----	-----	-----	HPPLC	Martin, et al., 1986
DOM, HIV, Zea	etanol, acetona acetomitrila/H ₂ O hexano coluna de Florisil	TMS	OV-17 (1,5X) 2 m x 3 mm DCE	2 µg	-----	Milho e trigo	EN Zea CL	Ueno, et al., 1986
TE, HTE, DAS, HXL, FX, LW, HIV	acetomitrila/H ₂ O coluna carvão ativo: alémiax	HFBT	SE-30 (5X) 2 m x 2 mm DCE	-----	95% (média)	-----	CCB HPPLC	Romer, 1986
HIV, DOM	metanol/H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ 10% coluna sílica gel	Tri Sil TBT HFBT	OV-3 (3X) 1,8 m x 2 mm DCE	-----	89% HIV 100% DOM	Trigo, farinha de trigo, fari- nha de milho, centeio, cevada	HFBT para confirmação	Scott e Kanhere, 1986
DOM, DOM ₂	hexano:acetomitrila cartuchos 1/8"	TMS/TMS HFBT	OV-17 (3X) 1,8 m x 2 mm DCE	0,1 µg/kg	82-85%	Leite	HFBT para confirmação	Swanson et al., 1986

Toxinas	Extração/ Purificação	Derivação	Coluna/Detector	Limite de Detecção do Método	% Recuperação do Método	Amostra	Confirmação Quantificação	Autor
DOM, 3 Acetil DOM, Zea	metanol:H ₂ O sabina benzoes ácido oxetano H.C	Tri Sil TBT	DB-1 25 m x 0,32 mm DCE	—	—	Trigo	HPLC Zea - OCB	Visconti et al., 1986
DOM	clorofórmio:etanol coluna sílica gel	HFBAA	DB-101 (DB) 1,8 m x 2 mm DCE	0,1 ng/kg	92%	Trigo	Padronização externa Estron col- laborative	Ware et al., 1986
Trigoes de tricotecenos DOM, MIV, T2 DAS	acetoneitrila:H ₂ O coluna carvão:celite: alumina coluna Florisil e sílica	hidrólise alcalina PFBA	DB 1701 15 m x 0,327 mm DCE	0,02 ng/kg 0,05 ng/kg em silagens	80%	Milho, soja, rações e si- lagens	Padrão interno diogeni T2 tetraol EN - Six	Good et al., 1988
Trigoes de tricotecenos T2, DAS, DOM MIV	EG e microlena de Florisil	hidrólise alcalina PFBA e TFA	DB 17 e DB 1701 15 m x 0,327 mm DCE	2,5 ng/kg	70 a 92%	Urina e plasma	EN-01	Good et al., 1988
DOM, MIV, DAS, T2, MTE	metanol/H ₂ O OH ₂ SO ₄ coluna sílica gel	HFBT TMS	DB 1701 15 m x 0,26 mm DCE	0,02 z 0,04 ng/kg	71 a 92%	Trigo	EN	Scott et al., 1989
DOM		HFBAA	DCE	—	89% milho 92% trigo	Trigo e milho	Padronização externa met WAVE	Wood e Carter, 1989
DOM	coluna sílica gel	HFBT	DB-5 30 m x 0,25 mm DCE	—	—	Milho	OCB	Hanoz et al., 1990
MIV, DOM, Setal, T2 tetraol	acetoneitrila metanol/H ₂ O coluna carvão ativo:alumina coluna celite	hidrólise alcalina TFA	DB 5 15 m x 0,53 mm DCE	0,05 ng/kg	55-100%	Trigo e milho	HPLC	Lauren e Agnew, 1991.

os limites de sensibilidade dos métodos que empregam este tipo de detector são muito altos, tornando-os inadequados para determinação destas toxinas em grãos (Scott, 1982).

A quantificação por detector de massas foi usada por Voyskner et alii (1985) para determinação de toxinas T2 e HT2, diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol, T2 tetraol, zearalenona em urina e plasma de suínos com limites de detecção variando de 1 a 10 ng. O mesmo sistema foi utilizado por Rajakyla e colaboradores (1987) para determinação de deoxinivalenol, toxinas T2 e HT2, zearalenona e ocratoxina em amostra de trigo. O limite de detecção variou de 100 pg a 1 ng.

Em 1980, Scheighardt e colaboradores usaram uma fase estacionária polar para separar deoxinivalenol e zearalenona, quantificados por fluorimetria, em amostras de alimentos e rações mistas.

Chang et alii (1984) empregaram coluna de carvão ativo e detector de ultravioleta para determinação de deoxinivalenol em trigo e seus derivados em 14 amostras de grãos. Os resultados obtidos comparados com os obtidos pelo método de Scott, que emprega cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, apresentaram um coeficiente de correlação de 0,992. Contrariando o que se esperava considerando-se que os tricotecetecenos do grupo B não absorvem no ultravioleta.

O uso de sistemas eletroquímicos de detecção vem sendo proposto como solução para determinação destas micotoxinas separadas por cromatografia líquida (Sylvia et alii, 1986; Betina, 1989 e Childress et alii, 1989). O composto de interesse para ser detectado por este sistema deve ser eletroquimicamente ativo mesmo em baixas concentrações (capaz de sofrer oxidação ou redução na superfície de um eletrodo). A seletividade do sistema de detecção é maior neste caso, pois poucos compostos são eletroquimicamente ativos.

Childress e seus colaboradores (1990) propuseram uma fotólise dos compostos separados por cromatografia líquida e detecção eletroquímica para aumentar a sensibilidade da determinação analítica. O limite de detecção obtido para deoxinivalenol em trigo estava na faixa de 0,010 a 0,020 mg/kg.

Também no caso de determinação de tricotecenos a tendência mais recente que vem se firmando em relação a fase estacionária, é o emprego de cromatografia líquida de fase reversa (C8 ou C18) associada aos diferentes sistemas de detecção possíveis (Schuh & Glawischnig, 1980; Bennett et alii, 1981; Schmidt et alii, 1981; Visconti & Bottalico, 1983; Schmidt & Rose, 1984; Laurem & Greenhalag, 1987; Thrane et alii, 1988).

2.2.1.5 - Confirmação de identidade

A confirmação faz-se necessária porque os métodos cromatográficos não são por si só conclusivos, com excessão de cromatografia gasosa usando detector de massas. Etapas prévias de limpeza e derivação podem não eliminar compostos que venham apresentar o mesmo comportamento cromatográfico. Para confirmação de tricotecenos pode-se usar reações químicas, testes biológicos e espectrometria de massas (Scott, 1982; Stahr, 1983; Bata et alii, 1984; King et alii, 1984; Romer, 1984; Sydenham & Thiel, 1987; Marocchi, 1988).

O uso de tempo de retenção e co-cromatografia (desenvolvimento simultâneo de amostra e padrão) não resolvem o problema de interferentes que possam apresentar comportamento cromatográfico semelhante. Dados obtidos em outros sistemas solvente, no caso de cromatografia em camada delgada, e noutras fases estacionárias, no caso de cromatografia gasosa, são considerados corroborativos no processo de confirmação.

Empregando as propriedades químicas do composto pode-se conseguir padronização de condições que permitam confirmá-los satisfatoriamente.

Os testes biológicos, para determinação quantitativa de tricotecenos são de pouco interesse por serem demorados, dispendiosos e pouco específicos uma vez que muitos compostos ocasionam os mesmos sintomas patológicos.

2.2.2 - Métodos Espectrométricos e Eletroquímicos

Kato et alii (1979), propuseram um método espectrofotométrico para determinar fusarenona X e toxina T2, baseado na capacidade dos tricotecenos reagirem em meio ácido liberando formaldeído. O formaldeído em presença de ácido cromotrópico ou ácido fenil J forma um complexo com absorvância máxima em 583 nm, para o ácido cromotrópico e 655 nm para o ácido fenil J. Com este complexo a fluorescência tem absorção máxima em 468 nm e emissão em 513 nm. Segundo os autores, os tricotecenos neosolaniol, nivalenol, tetracetil nivalenol, diacetoxiscirpenol e toxina HT2 também apresentaram resultados satisfatórios. Os níveis de micotoxinas detectados quando o reagente é o ácido cromotrópico são: 50 - 1000 mg/l de fusarenona X; 50 - 1500 mg/l para a toxina T2. Se o reagente é o ácido fenil J, os níveis são de 30 - 1200 mg/l de fusarenona X e 150 - 2000 mg/l para toxina T2.

Recentemente o uso de um espectrômetro de massas acoplado a outro vem despertando o interesse dos analistas de micotoxinas, por não necessitar de prévia separação por métodos cromatográficos e serem menos exigentes com o aspecto de limpeza prévia da amostra (Pawlosky et alii, 1989). O procedimento geral para este tipo de análise consiste nas seguintes etapas: a) preparação da amostra, mais especificamente extração; b) seleção do composto de interesse na matriz, por espectrometria de massas, usando na maioria dos casos o íon molecular, como cátion ou como ânion; c) um segundo estágio de espectrometria de massas onde é efetuada a análise dos compostos propriamente dita.

Plattner & Bennett (1983), descrevem as condições desta técnica para a determinação de zearalenona e deoxinivalenol em grãos de milho, trigo, aveia e arroz. Conseguiram detectar concentrações destas toxinas abaixo de 1 mg/kg, sem necessidade de uma limpeza do extrato. O tempo necessário para determinação em cada amostra foi de dez minutos.

Kalinowski e colaboradores (1986) descreveram a extração de tricotecenos com fluido supercrítico e injeção direta dos extratos de trigo em espectrômetros de massas.

Apesar das vantagens em termos de rapidez, sensibilidade e especificidade, estes métodos não são muito utilizados por causa da sofisticação e custo do equipamento.

Dentre os métodos eletroquímicos, os métodos polarográficos apresentam possibilidade de serem usados para determinação de tricotecenos com ou sem acoplamento ao cromatógrafo líquido de alta eficiência (Scott, 1982; Eppley, 1979). Tricotecin foi determinado, por esta técnica, em culturas líquidas e o limite de detecção estava em torno de 0,2 mg/kg (Eppley, 1979). Para grãos esta técnica não é muito difundida, sendo mais comum para culturas líquidas e padrões.

No entanto, Palmisano et alii (1981) usaram o pulso polarográfico diferencial para determinação de deoxinivalenol em milho. Obtiveram 25% de recuperação para amostras contendo 1 mg/kg da toxina e 20% para amostras contendo 0,2 mg/kg (Scott, 1982).

Impedimetria para detectar toxina T2 foi empregada por Adak e colaboradores (1987).

Visconti & Bottalico (1983) usaram pulso polarográfico característico para determinar nivalenol, deoxinivalenol e fusarenona X em milho contaminado. O limite de detecção do método foi de 0,05 mg/kg e a recuperação variou de 20 a 70%. Numa comparação com cromatografia gasosa, a correlação entre os valores obtidos para nivalenol e fusarenona X foi maior que 0,9.

2.2.3 - Métodos Enzimáticos

Procedimentos enzimáticos também são utilizados para determinação de tricotecenos. Um deles utiliza a propriedade da enzima glutathione-S epóxido transferase em catalisar a reação de conjugação entre um tricoteceno e excesso de hormônio gonadotrópico (GSH). A determinação do epóxido é indireta, ou seja pela quantidade de GSH que não reagiu. Por este procedimento submicrogramas de toxina podem ser detectadas (Eppley, 1979; Snyder, 1986). O grupamento epóxido também é quantificado por sua reação com a enzima álcool desidrogenase, que possui grupamento SH (Snyder, 1986). Os métodos enzimáticos não apresentam especificidade.

2.2.4 - Imunoensaios

Os métodos de imunoensaio são baseados na interação entre a micotoxina e um anticorpo, geralmente produzido por coelhos pela injeção da toxina homóloga. As micotoxinas não são antigênicas, pois são metabolitos de baixo peso molecular, assim precisam ser conjugadas a um polipeptídeo ou proteína para que desenvolvam atividade imunizante.

No caso específico dos tricotecenos, que não possuem grupo químico que possa ser diretamente conjugado com proteína, é necessário a introdução de grupos reativos, como por exemplo carboxilas. Portanto, mesmo para determinações imunológicas os tricotecenos precisam de uma etapa de derivação. A proteína usual para este tipo de conjugação é a albumina de soro bovino, mas gamaglobulinas e polilisina também são empregadas.

Para micotoxinas são dois os tipos de imunoensaios disponíveis: os de radioimunoensaio (R.I.A) e de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Ambos são baseados na ligação entre a toxina livre na amostra e um sítio específico da molécula do anticorpo.

Comercialmente estão disponíveis "kits" para R.I.A. de toxina T2, zearalenona e deoxinivalenol. Para toxina T2 os limites de detecção variam de 0,001 a 0,005 mg/kg em amostras de trigo, milho, leite e urina (Chu, 1984; Xu et alii, 1986).

Os métodos de ELISA são os mais utilizados para tricotecenos, e neste caso também as micotoxinas determinadas são toxina T2, diacetoxiscirpenol e deoxinivalenol. Os limites de detecção reportados são de 5,0 pg para diacetoxiscirpenol e 0,1 ppb para toxina T2. Autores como Chiba e colaboradores (1984); Xu e colaboradores (1986); Casale e colaboradores (1987); Mills e colaboradores (1988); descrevem procedimentos de preparação de anticorpos e/ou emprego de métodos de ELISA. As amostras analisadas são de grãos, soro, sangue, leite e urina. Uma limitação apresentada por

estes métodos é a possibilidade de ocorrerem ligações cruzadas com alguns tricotecenos em função da semelhança de estrutura (Chu, 1984).

No ano de 1990 e 1991 o avanço nas técnicas de imunoensaio ficou muito bem caracterizado pelo surgimento de novos procedimentos em número bem maior que das técnicas cromatográficas. Por exemplo, técnicas de imunoensaio para toxina T2 continuaram sendo descritas, mas também tricotecenos nunca antes estudados por estes métodos foram contemplados, como o tetracetato de nivalenol e diaacetoxisperno] (Abouzied, 1991 e Scott, 1991). Estudos colaborativos e meios de torná-los disponíveis ainda são necessários (Scott, 1992).

2.2.5 - Métodos Biológicos

Os métodos biológicos foram desenvolvidos considerando a citotoxicidade dos tricotecenos. Com relação ao tipo de efeito citotóxico são comuns os testes descritos na Tabela 4 (Ueno, 1983; Snyder, 1986).

Tabela 4 - Testes biológicos

Teste	Procedimento	Animais	Efeito
toxicidade a pele	injeção intradérmica avaliação em 24, 48 e 72 horas	coelhos ratos e porqui- nhos da índia	danos na pele
emese	ingestão de rações com níveis conhecidos da toxina	patos, cachorros e camundongos	vômitos
citotoxicidade	efeitos em células eucarióticas		danos nas células

São descritos pela literatura procedimentos onde são usadas células de HeLa, Artemia salina, ovos de Aedes aegypti, Leishymana pyriformis, etc. onde são verificados os danos decorrente da ação de uma toxina (Hokes et alii, 1987).

A diminuição da capacidade germinativa de sementes é um outro parâmetro utilizado para verificação da presença de tricotecenos em amostras.

Estes métodos são muito úteis para estudar as características toxicológicas dos tricotecenos, mas por sua pouca especificidade não são muito adequados para sua quantificação em amostras. Uma outra desvantagem vem a ser a necessidade de utilizar muitos animais num único teste, o que é trabalhoso e dispendioso.

2.3 - Outras micotoxinas

Nos anos sessenta, com a descoberta das aflatoxinas, iniciou-se a história das micotoxinas, sob o ponto de vista analítico. Até aquela época apesar de inúmeros relatos de toxicoses ocorridas em animais e humanos que haviam ingerido alimentos infestados por fungos, pouco se sabia da natureza dos compostos causadores dos danos. A partir de então, os métodos analíticos, as estruturas químicas, os efeitos toxicológicos e os organismos produtores estão sendo amplamente estudados (Bullerman, 1979; Goldblatt & Winner, 1977; Soares, 1987).

Ao lado dos tricotecenos, as micotoxinas aflatoxinas B1, B2, G1, G2, esterigmatocistina, ocratoxina e zearalenona são as mais estudadas, tanto sob o aspecto de metodologia analítica, como de relatos de incidência em diferentes zonas geográficas. Na Tabela 5 estão resumidos alguns aspectos destas micotoxinas.

Tabela 5 - Aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina e zearalenona, suas características químicas e toxigênicas e incidência em alimentos.

Micotoxinas	estrutura química	organismos produtores	efeitos tóxicos	incidência
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	cumarinas substituídas ligadas a deidrofurano	<u>A. flavus</u> <u>A. parasiticus</u>	-carcinogênicos p/ muitas espécies inclusive humanos -teratogênicos p/ cricetos -mutagênicos	amendoins, milho, sementes de algodão, sorgo, trigo, aveia, cevada, nozes, semente de abóbora, castanha do Pará, pistache
Esterigmatocistina	deidrofurobenzeno acoplada a xantona (interm. na síntese de aflas)	<u>A. rugulosus</u> <u>A. versicolor</u> <u>A. nidulans</u> <u>Bipolaris</u> <u>Chaetomium</u> <u>Chaetomium</u>	-lesões hepáticas e renais em ratos e macacos -potência carcinogênica de 1/10 da aflatoxina B ₁	poucos relatos: -trigo, café cru, nozes pecans mofadas e casca de queijo.
Ocratoxina A	beta fenilalanina ligada a isocumarina	<u>A. ochraceus</u> <u>A. sulphurus</u> <u>A. melleus</u> <u>A. sclerotium</u> <u>A. ostianus</u> <u>A. petrekki</u> <u>P. veridicatum</u> <u>P. variabile</u>	-nefrotóxina (ne- crose do epitélio tubular -teratogênica p/ ratos, cricetos e camundongos	-milho, soja, trigo sarraceno, cevada, centeio, arroz, sorgo, feijão, amendoim, castanha do Pará -superfície de produtos, pimenta, do reino, café
Zearalenona	derivada do ácido resorcílico	espécies do gênero <u>Fusarium</u> , principalmente <u>F. roseum</u> e subespécies	-estrogênio afetando órgãos e processos reprodutivos em várias espécies, principalmente suínos -efeito teratogênico proporcional a dose	milho, sorgo, trigo e outros grãos cereais

As condições ótimas para crescimento de fungos produtores de aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina e zearalenona estão em faixas de temperatura muito próximas. Porém a zearalenona é produzida pelos fungos do gênero Fusarium em temperaturas em torno de 10 - 12°C, ao passo que, as outras micotoxinas são produzidas em temperaturas em torno de 25°C (Soares, 1987).

Espécies diferentes de fungos produtores destas toxinas podem contaminar simultaneamente os grãos e a sua toxicidade é influenciada por muitos fatores, inclusive geográficos e climáticos.

Inúmeros métodos tem sido propostos, tanto para a determinação individual quanto simultânea das aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina e zearalenona. Os métodos multitoxinas apresentam economia de tempo e de reagentes.

Muitos solventes orgânicos são usados para extração de multimicotoxinas, mas as misturas de solventes polares (metanol, acetonitrila) e água são as mais utilizadas por extraírem menor número de lipídes (Soares, 1987; Kuiper-Goodman et alii 1987). Nas etapas de limpeza são empregados solventes para desengorduramento (hexano, éter de petróleo), clarificação com agentes precipitantes, limpeza com minicolunas, partição e diálise individualmente ou em várias combinações de sistemas. Os métodos de triagem empregam minicoluna para determinações individuais de toxinas ou camada delgada para determinações individuais ou simultâneas.

A confirmação é necessária. A co-cromatografia, eluição em diferentes solventes e revelação em sistemas diferentes fornecem dados corroborativos. As reações químicas são mais simples e conclusivas, quando são empregadas sob condições padronizadas. A espectrometria de massas também é utilizada.

Na etapa de quantificação quando a separação é feita por cromatografia em camada delgada, o uso de densitômetros melhora os resultados por diminuir os coeficientes de variação. A quantificação visual, comparando com a fluorescência de padrões, sob luz ultravioleta/visível, no entanto, é mais comumente empregada.

A quantificação na cromatografia líquida de alta eficiência, com detector por fluorescência diminui os limites de detecção em até mais de dez vezes para as aflatoxinas. Porém, a maioria das micotoxinas tem seus limites de detecção melhorados em CLAE se comparados com os obtidos em camada delgada.

A zearalenona é a única destas micotoxinas que pode ser quantificada por cromatografia gasosa após a silanização ou fluorilação e os limites de detecção são também menores que os de camada delgada e semelhantes aos de cromatografia líquida de alta eficiência.

O método proposto por Soares (1987) para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, esterigmatocistina, ocratoxina A e zearalenona, vem sendo muito utilizado por seus baixos níveis de detecção e boa recuperação e repetibilidade. Por outro lado sua simplicidade e baixo custo atende bem as necessidades nacionais (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da avaliação intra-laboratorial do método multitoxina preconizado por Soares (1987).

Micotoxina	limite de detecção (ug/Kg)	coeficiente de variação médio (%)	recuperação média (%)
aflatoxina B ₁	2	26,5	96,1
esterigmatocistina	35	15,7	106,8
ocratoxina A	10	17,7	111,0
zearalenona	165	8,5	105,8

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes, Solventes e Solução

Alumina neutra, atividade I (90), marca Merck.

Carvão ativo, 14-60 mesh, marca Sigma.

Celite comercial

Heptafluorobutirilimidazol (HFBI), marca Pierce

Placas de sílica gel G60 0,2 mm de espessura, marca Merck.

Padrões de tricotecenos:

- diacetoxiscirpenol, toxinas HT2, T2, T2 tetraol e T2 triol, Makor Chemical Ltda, Israel.
- deoxinivalenol, Sigma Chemical Co, E.U.A.
- nivalenol, Wako Chemical Pure Industries Ltda, E.U.A.

Solução de trifluoreto de boro a 20% em metanol, marca Merck

Solventes e reagentes de uso comum.

3.2. Equipamentos

Espectrofotômetro ultravioleta/visível, modelo Lambda 6, marca Perkin Elmer.

Cromatógrafo a gás, marca Varian, modelo 3300, com injetor split/splitless e detector por ionização em chama, equipado com coluna de sílica fundida com fase DB-225 (25% de cianopropilfenil e 75% de dimetilsilicone e 15 m/0,3 mm de diâmetro), acoplado a integrador Intralab 4290.

Lâmpada UV de alta intensidade, modelo UVGL 58, multibanda 254/366 nm, Mineral Light.

Banho-maria, marca Fanem, modelo 100.

3.3. Amostras

3.3.1. Seleção e coleta de amostras

Para análise de micotoxinas, neste trabalho, foram utilizadas amostras de grãos de trigo (Triticum aestivum, L), separados em dois grupos. Um grupo constituído por 20 amostras cuja variedade, local de cultivo e condições climáticas eram conhecidos; outro constituído por 18 amostras comercializadas na região de armazenamento.

No primeiro grupo as amostras de grãos de trigo pertenciam as variedades BH1146 e IAC24, colhidas durante a safra de 1990. A primeira variedade é tradicional, rústica de porte alto (1,0 a 1,10 m) utilizada desde 1955. A segunda é uma variedade empregada a partir de 1983, de alto potencial produtivo, de porte baixo (0,70 a 0,80 m) e resistente ao acamamento. As duas foram cultivadas nos campos experimentais do Instituto Agronômico de Campinas, SP., nas regiões de Campinas, Cândido Mota, Cruzália, Florínea, Itararé, Mococa, Monte Alegre do Sul, Pindorama, São José das Laranjeiras e Tietê (Figura 3).

No segundo grupo estão as amostras provenientes do Rio Grande do Sul, coletadas em moinhos e silos que abastecem o comércio na zona sul do Estado, mais especificamente localizados nas cidades de Rio Grande e Pelotas. As amostras, cerca de 1 kg, foram coletadas pelos funcionários dos armazéns durante a movimentação dos grãos. Neste caso os lotes de amostra foram separados por ano de colheita (safras de 1988, 1989 e 1990), local de coleta (silos do Terminal de Trigo e Soja e moinhos), local de cultivo da amostra (Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai) e época de tomada da amostra (outubro de 1990, marco de 1991 e agosto de 1991).

3.3.2. Preparo e armazenamento de amostra para análise

A totalidade das amostras de grãos de trigo foram avaliados quanto ao seu aspecto: cor, presença de pontos pretos, contaminação fúngica, grãos murchos, secos e quebrados.

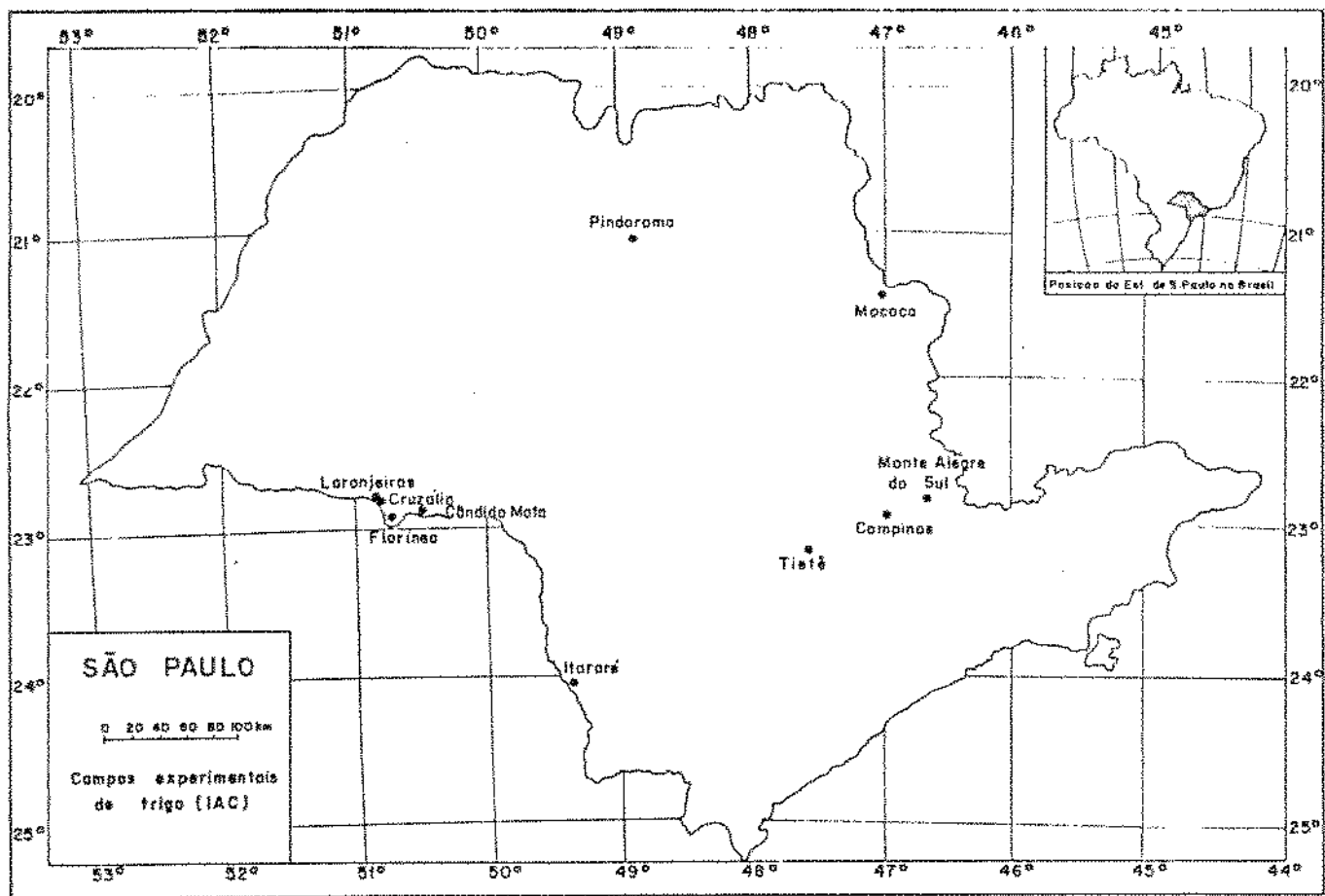


Figura 3 - Localização dos campos experimentais de trigo do Instituto Agrônomo de Campinas.

Os grãos foram moidos em liquidificador doméstico para obtenção de uma farinha semelhante a integral encontrada no comércio. De cada amostra obteve-se em torno de 800 g de farinha homogênea que foram embaladas em sacos plásticos contendo 50 g de amostra.

Todas as embalagens foram armazenadas em freezer a -10°C até o momento da análise.

3.4- Determinação de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, Esterigmatocistina, Ocratoxina A e Zearalenona

As determinações destas micotoxinas foram efetuadas em camada delgada, segundo o procedimento descrito por Soares (1987).

Inicialmente foi feita a triagem das micotoxinas em todas as amostras. Em seguida, as amostras com resultados presuntivos positivos foram submetidos a confirmação por reações químicas.

A confirmação da aflatoxina B₁ foi através da reação com ácido trifluoroacético de acordo com procedimento descrito por Przybylsky (1975). O extrato suspeito de contaminação com esterigmatocistina foi confirmado por acetilação com anidrido acético:piridina (Stack & Rodricks, 1971). A ocratoxina foi confirmada por derivação com trifluoreto de boro, de acordo com o procedimento de Hunt e colaboradores (1980). A zearalenona foi confirmada por acetilação com anidrido acético:piridina (Golinski & Grabarkiewicz-Szczena, 1984).

A amostras positivas foram quantificadas por comparação visual com padrões sob luz ultravioleta.

3.5.- Desenvolvimento de um procedimento para determinação de tricotecenos em grãos de trigo

3.5.1.- Preparo de padrões

Neste trabalho foram empregados 5 padrões de tricotecenos do grupo A: diacetoxiscirpenol (DAS), toxina HT2 (HT2), toxina T2 (T2), T2 Tetraol e T2 Triol. Dos tricotecenos do grupo B foram empregados o deoxinivalenol (DON) e o nivalenol (NIV).

As soluções estoques foram preparadas dissolvendo-se os compostos em benzeno. As concentrações das soluções foram calculadas através das massas obtidas por diferença após a lavagem e secagem dos frascos.

A determinação das concentrações das soluções estoque de diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol, nivalenol, T₂ e HT₂ foi também realizada pelo procedimento descrito por Bennett e Shotwell (1990) utilizando os coeficientes de extinção em luz ultravioleta.

3.5.2 - Avaliação da pureza dos padrões de tricotecenos

A avaliação da pureza dos padrões de tricotecenos foi baseada em três parâmetros: número de manchas verificadas em camada delgada, espectro de absorbância na região do ultravioleta e número de picos obtidos após cromatografia gasosa.

A cromatografia em camada delgada dos padrões de tricotecenos foi desenvolvida em placas prontas de sílica (Merck), tendo como eluente uma mistura de clorofórmio: metanol (97 + 3). As placas foram observadas após a secagem sob luz ultravioleta (ondas longas e curtas). Em seguida, efetuou-se a pulverização das placas com solução de ácido sulfúrico a 20% em metanol e realizou-se outra observação sob luz ultravioleta.

Foram obtidos espectros das soluções estoque dos padrões de DAS, DON, HT₂, NIV e T₂ em espectrofotômetro UV/Vis. A região do espectro avaliada foi de 400 a 190 nm com os padrões dissolvidos em metanol (Bennett & Shotwell, 1990).

O cromatograma obtido após a derivação com heptafluorobutirilimidazol e observação do número de picos obtidos para cada tricoteceno foi outro parâmetro utilizado para avaliar a pureza de soluções de padrões.

3.5.3.- Estudo de parâmetros que influenciam a derivação de tricotecenos com heptafluorobutirilimidazol (HFBI)

Tomando-se como ponto de partida o procedimento de Scott e colaboradores (1988) para derivação de tricotecenos, com HFBI, para determinação por cromatografia gasosa, foram estudados os seguintes parâmetros: a) razão entre os solventes utilizados como meio de reação, empregando-se a mistura tolueno-acetonitrila nas

seguintes proporções 85+15 ; 90+10; 95+5; b) tempo de derivação: 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos quando a reação ocorria em banho maria a 60°C; c) temperatura de derivação: temperatura ambiente por 18 horas, 80°C por 20 minutos e 60°C por diferentes tempos; d) relação solvente (tolueno:acetoneitrila) e reagente acilante (HFBI) nas seguintes proporções 10:0,5; 10:1; 10:2 e 10:3; e) lavagem de fase orgânica após a derivação com tampão fosfato pH 7.0, ou solução de bicarbonato de sódio 1% ou solução de amônia 1%.

3.5.4.- Otimização das condições para cromatografia gasosa de tricotecenos

O equipamento constou de um cromatógrafo marca Varian, modelo 3300, com a configuração: detector por ionização em chama/injetor splitless. A coluna utilizada foi de sílica fundida com 15 m de comprimento e 0,3 mm de diâmetro interno. A fase estacionária empregada foi 25% de cianopropilfenil e 75% de dimetilsilano (DB 225), com 0,25mm de espessura. Como gás de arraste foi usado H₂.

As condições estudadas para injeção da amostra foram: temperatura do injetor (250, 275 e 300°C), tempo de abertura da válvula (0,5; 0,75 e 1 minuto), fluxo de limpeza do injetor e injeção com e sem efeito solvente.

Diferentes programações de temperatura da coluna foram estudadas sempre considerando a resolução da mistura de padrões, tempo de análise e temperatura máxima recomendada para a coluna.

3.5.5 - Determinação dos tempos de retenção dos padrões de tricotecenos

As seguintes condições foram utilizadas para cromatografia gasosa de tricotecenos:

a) programação do forno: temperatura da coluna 100°C durante 1 minuto, aumentando 30°C/minuto até 155°C, permanecendo 5 minutos e aumentando 5°C/minuto até 220°C permanecendo 40 minutos;

- b) temperatura do injetor: 275°C;
- c) abertura de válvula aos 0,75 minutos;
- d) fluxo de limpeza do injetor: 25 ml/min;
- e) temperatura do detector: 300°C;
- f) Atenuação: 16×10^{-12}

Nestas condições foram determinados os tempos de retenção relativos dos tricotecenos acilados com heptafluorobutirilimidazol e seus fatores de separação com relação a um padrão interno, segundo o procedimento descrito abaixo:

- Aliquotas contendo até 50 ug de tricoteceno foram transferidas com pipetador automático para frascos, com capacidade para 5 ml, e o solvente foi evaporado sob N₂ e aquecimento. Foram adicionados 500 ul de uma mistura de tolueno:acetonitrila (95+5) e 50 ul de HFBI que, após agitação por um minuto, em banho ultra-sônico foram deixados em banho-maria a 60°C por 1 hora. Após o resfriamento a fase orgânica foi lavada com tampão fosfato pH 7,0 (1 ml em duas vezes). Após a separação das fases foi tomada uma alíquota para ser transferida para um frasco contendo o padrão interno, evaporada e armazenada a -15°C. No momento de realizar a cromatografia foram redissolvidos em um volume adequado de hexano.

O padrão interno utilizado foi o metil araquidato dissolvido em hexano.

3.5.6. - Curvas padrão de tricotecenos

A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho com as seguintes concentrações: 83 ug/ml DAS; 50 ug/ml DON; 50 ug/ml HT2; 50 ug/ml NIU; 60 ug/ml T2 ; 50 ug/ml T2 tetraol; 50 ug/ml T2 triol.

Aliquotas contendo entre 25 a 45 ug de padrão foram transferidas com pipetador automático para frascos, e evaporadas sob N₂. Em seguida foram derivadas com HFBI conforme o procedimento descrito no item 3.5.5.

As alíquotas de fase orgânica transferidas para frascos contendo 4 ug/ul de ester metílico de ácido araquídico foram evaporadas sob N₂. Estas foram redissolvidas em hexano, de modo a se obter concentrações variando entre 5 e 100 ng/ul, dependendo da sensibilidade do detector na configuração utilizada.

As áreas obtidas foram colocadas em gráficos, estando nas abscissas as áreas relativas e nas ordenadas as concentrações dos padrões injetados. Segundo os procedimentos estatísticos descritos por Caulcutt & Boddy (1983) foram calculadas as retas ideais, o intervalo de confiança para inclinação e intersecção das diferentes retas, as melhores retas passando pelo ponto zero e o limite de detecção para cada tricoteceno estudado.

3.5.7.- Extração e limpeza de extratos de amostras de grãos de trigo

Para escolha do método mais adequado para extração, clarificação e limpeza dos extratos de amostras de grãos de trigo para determinação de tricotecenos, dois procedimentos foram examinados. Originalmente estes procedimentos haviam sido desenvolvidos para cromatografia em camada delgada. Um descrito por Soares (1987) para determinação de aflatoxinas, ocratoxina A, esterigmatocistina e zearalenona e outro descrito por Marochi (1988) para determinação de tricotecenos e zearalenona.

Nestes métodos foram efetuadas modificações cujos efeitos foram acompanhados por cromatografia de camada delgada e cromatografia gasosa. Como amostras foram usados refugos de grãos de trigo dos experimentos do Instituto Agronômico de Campinas, homogeneizados no liquidificador.

Estas amostras foram submetidas a triagem pelo procedimento de Marochi (1988). A presença de tricotecenos não foi constatada e para serem usadas durante o estabelecimento do procedimento de extração e limpeza foram contaminadas com diacetoxiscirpenol.

As modificações avaliadas no procedimento de Marochi (1988) usando cromatografia de camada delgada foram:

- a) uso ou não de hexano antes da partição para desengordurar o extrato;
- b) clarificação com gel férrico, carvão ativo e carbonato de cobre passando e não passando posteriormente em mini coluna de Celite: alumina nas proporções de 0,7:0,3 e 1:0,5g, eluindo o tricoteceno com clorofórmio. Esta coluna foi proposta originalmente por Trucksess (1984) para determinação de deoxinivalenol.

No procedimento de Soares (1987) as modificações avaliadas por camada delgada foram: a) adição de uma etapa de limpeza constando de uma passagem por minicoluna de carvão-ativo: Celite: alumina (0,7:0,3:0,5g) eluindo com clorofórmio; b) clarificação com sulfato de amônio (30%), carbonato de cobre e carvão ativo não passando e passando ao final d limpeza por minicoluna de Celite: alumina (0,7:0,3 ou 1:0,5g) eluindo com clorofórmio.

Por cromatografia gasosa usando colunas SE-54 e DB-225, avaliou-se o procedimento de Soares (1987) com introdução ou não de minicoluna na etapa de limpeza e o procedimento de Marochi (1988) com e sem desengorduramento, com e sem limpeza em minicoluna.

3.6 - Avaliação da metodologia proposta

3.6.1 - Teste de Rusticidade

Durante a otimização do procedimento escolhido para clarificação e limpeza de amostras de trigo observou-se que as etapas críticas para o processo quantitativo foram a limpeza em minicoluna e a derivação do tricoteceno para cromatografia gasosa. Estas etapas foram então examinadas em um teste de rusticidade, segundo o procedimento descrito por Wernimont (1985).

As variáveis consideradas estão na Tabela 7.

Tabela 7 - Variáveis examinadas no teste de rusticidade

Variáveis	Condição básica	Condição Alternativa
A-Vazão da coluna	por gravidade	pressionando com embolo
B-Tempo de derivação	60 minutos	90 minutos
C-Volume de solvente para eluição da coluna	30 ml	40 ml
D-Solvente para eluição da coluna	clorofórmio	tolueno-acetonitrila (95+5)
E-Empacotamento da coluna	rolando com as mãos	adição e pressão sucessivas da fase estacionária com embolo
F-Temperatura de secagem após a derivação	ambiente sob N ₂	com aquecimento sob N ₂
G-Tempo de uso do HFBI	frasco recém aberto	frasco já aberto a 30 dias

As variáveis foram combinadas dentro de oito possibilidades, de acordo com o esquema:

- 1- todas as condições básicas
- 2- c e f g (condições alternativas empregadas)
- 3- b d f g (condições alternativas empregadas)
- 4- b c d e (condições alternativas empregadas)
- 5- a d e g (condições alternativas empregadas)
- 6- a c d f (condições alternativas empregadas)
- 7- a b e f (condições alternativas empregadas)
- 8- a b c g (condições alternativas empregadas)

Como amostra empregou-se uma mistura de padrões contendo um tricoteceno do grupo A (DAS) e um tricoteceno do grupo B (NIV) contendo 83ug de DAS e 100ug de NIV por ml da mistura.

Em cada teste foram passados em minicoluna 500 μ l da mistura que após a derivação foram injetados em cromatografo a gás contendo teoricamente 25 μ g de DAS e 30 μ g de NIV em cada injeção.

Os resultados permitiram estabelecer quais os mais importantes dentre os fatores estudados com relação a quantificação de tricotecenos.

3.6.2.- Recuperação

Amostras não contaminadas naturalmente foram fortificadas (segundo o procedimento descrito por Marochi 1988) com alíquotas de padrões de DAS e NIV em sete níveis diferentes.

As amostras assim contaminadas foram extraídas e clarificadas pelo procedimento de Soares com adição de uma passagem pela minicoluna de carvão: Celite: alumina (0,7:0,3:0,5), proposta por Trucksess (1984).

3.6.3- Repetibilidade em amostras fortificadas

A repetibilidade foi testada em amostras artificialmente contaminadas com T2 tetraol, T2 triol, diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol e nivalenol, de acordo com o procedimento descrito por Marochi (1988). A minicoluna de carvão/Celite/alumina, foi eluida com tolueno-acetonitrila (95+5).

3.6.4 - Repetibilidade em amostras naturalmente contaminadas.

Os coeficientes de variação de determinações em triplicatas de amostras naturalmente contaminadas e analisadas foram calculadas para avaliar a repetibilidade do método.

3.7 - Procedimento proposto para determinação de DAS, DON, NIV, HT2, T2, T2 triol e T2 tetraol em trigo.

Dos parâmetros estudados resultou o procedimento para determinação de tricotecenos cujas etapas estão esquematizados na Figura 4 e descritas abaixo:

- 1) Extrair 50 g de amostra durante 5 minutos em liquidificador com 270 ml de metanol e 30 ml de solução de 4% de cloreto de potássio; 2) Filtrar em papel de filtro sanfonado. Transferir uma alíquota de 150 ml do filtrado para um bequer contendo 150 ml de solução de sulfato de amônio 30% e 50 cm³ de celite. Homogeneizar com bastão de vidro e deixar em repouso por 5 minutos ou mais, antes de filtrar novamente em papel de filtro sanfonado;
- 3) transferir 150 ml do filtrado para um funil de separação contendo 150 ml de água destilada. Adicionar 10 ml de clorofórmio;
- 4) Efetuar a partição agitando lentamente por 3 minutos deixando separar as camadas (no mínimo 10 minutos). Recolher a fase clorofórmica em bequer. Retirar uma alíquota de 5 ml para um frasco;
- 5) Repetir a partição com mais 10 ml de clorofórmio. Retirar uma nova alíquota de 5 ml, junta-la ao frasco contendo a primeira alíquota;
- 6) Evaporar o clorofórmio em banho-maria;
- 7) Preparar minicolunas contendo 0,7 g de carvão ativo, 0,5 g de alumina e 0,3 g de Celite lavada (A.D.A.C., 1990), misturar e empacotar em seringas de injeção (5 ml) contendo lâ de vidro e sulfato de sódio anidro no fundo. Após adicionar o recheio, rolar nas mãos para acomodação da mistura. Após a adição da fase estacionária acrescentar uma fina camada de sulfato de sódio anidro no topo;
- 8) Ressuspender o extrato três vezes com 200 ul de clorofórmio ou tolueno-acetonitrila (95+5) agitar cada vez em banho ultra-sônico e aplicar na minicoluna a cada nova ressuspensão;
- 9) Efetuar a eluição com 50 ml de clorofórmio quando for para triagem ou 40 ml da mistura de tolueno:acetonitrila (95+5) para amostras a serem quantificadas. Evaporar o solvente em banho maria sob uma corrente de nitrogênio;
- 10) Efetuar a derivacão, adicionando 500 ul da mistura tolueno:acetonitrila (95+5) e 50 ml de HFBI. Agitar a mistura por 1 minuto em banho ultra-sônico. Deixar em banho maria a 60°C durante 1 hora. Esfriar as amostras, acrescentar mais 500 ul da mistura de solventes e agitar. Lavar a fase orgânica em duas vezes com 1 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, agitando 1 minuto em banho ultra-sônico. Em seguida deixar em congelador para efetuar melhor a separacão das fases;

11) Transferir com pipetador automático 500ul ou 300ul de fase orgânica, respectivamente para a triagem ou quantificação para frascos contendo 4 ug de metil araquidato. Evaporar sob N₂ e à temperatura ambiente. Redissolver com 100ul de hexano e agitar em banho ultra-sônico antes de injetar no cromatógrafo.

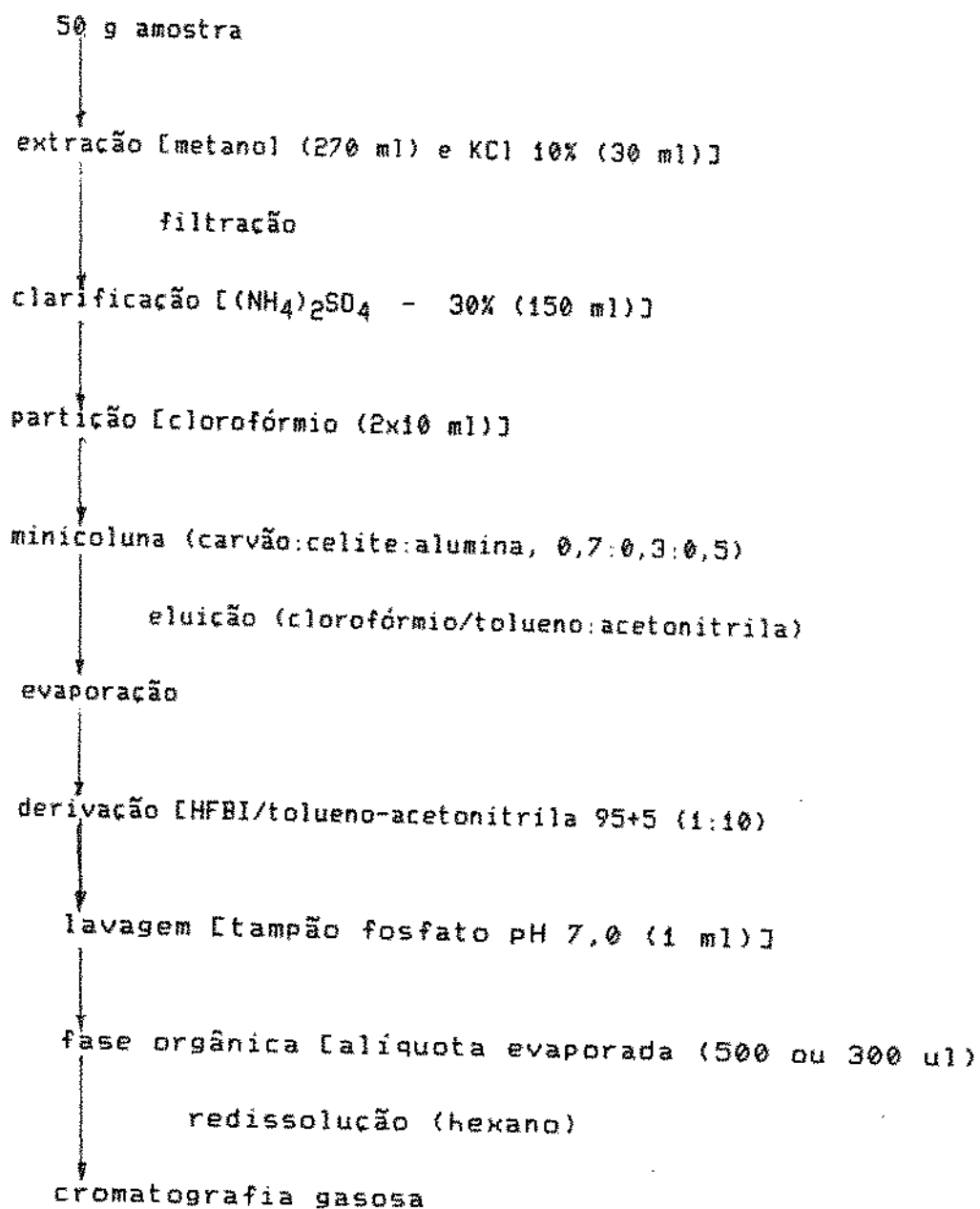


Figura 4 - Método proposto para determinação de tricotecenos em amostras de trigo.

3.8 - Confirmação da identidade dos tricotecenos em amostras positivas.

A confirmação dos tricotecenos nas amostras foi feita através de reações químicas. Após a execução da reação escolhida, o procedimento proposto para derivação com HFBI foi efetuado como descrito em 3.7.

Os tricotecenos, após as reações químicas e exposição ao HFBI, apresentam tempos de retenção diferentes dos apresentados com a derivação direta com HFBI.

A seguinte rotina foi empregada:

- a) Fortificação das amostras suspeitas com padrões derivados
- b) Acetilação para tricotecenos do grupo A e do Grupo B, usando o procedimento de Stahr e colaboradores (1983) modificado.
- c) Hidrólise dos tricotecenos do grupo A usando modificações nas condições propostas por Sigg e colaboradores (1965).
- d) Redução dos tricotecenos do grupo através de modificações no procedimento de Grove (1984).

3.8.1 - Acetilação

Evaporar uma alíquota contendo até 40 ug de tricoteceno. Deixar o resíduo, durante duas horas a 60°C, em meio contendo 200ul de mistura de piridina:anidrido acético na proporção de 1:1. Após resfriamento, evaporar a mistura à temperatura ambiente sob corrente de nitrogênio. Em seguida, efetuar a derivação com HFBI pelo procedimento descrito em 3.7.

3.8.2 - Hidrólise

Este procedimento foi estudado e definido apenas para tricotecenos do grupo A e consiste em:

- evaporar alíquotas contendo 40ug de tricoteceno. Adicionar 1ml de solução de metanol:amônia (10:1). Deixar em banho-maria a 60°C durante 4 horas e evaporar sob nitrogênio, com aquecimento. Efetuar a derivação com HFBI como descrito em 3.7.

3.8.3 - Redução

A redução de tricotecenos foi efetuada em amostras contendo até 30 ug da micotoxina. O procedimento consiste em adicionar 200 ul de uma solução contendo 2mg/ml de NaBH₄ (boridreto de sódio) deixando reagir a temperatura ambiente por 24 horas. Neutralizar a mistura com HCl 2N e evaporar sob nitrogênio, com aquecimento. Em seguida, derivar o extrato com HFBI como descrito em 3.7.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Desenvolvimento de metodologia para determinação de tricotecenos por cromatografia gasosa.

4.1.1 - Concentração dos padrões de tricotecenos

A concentração dos tricotecenos não é usualmente determinada através do seu coeficiente de extinção, pois a maioria deles não absorve no ultravioleta/visível.

Rotineiramente as concentrações dos padrões de tricotecenos são determinadas apenas pela diferença de massa do conteúdo dos frascos comerciais contendo o composto, mas por se tratar de compostos naturais não são puros. Considerando esta dificuldade, Bennett & Shotwell (1990) recomendam a determinação de concentração de padrões de tricotecenos através dos coeficientes de extinção por eles determinados experimentalmente.

Ao empregar este procedimento no laboratório foram encontrados problemas, tais como:

- a) os comprimentos de onda correspondentes às absorvâncias máximas para diacetoxiscirpenol, toxinas Ht2 e T2 estavam em torno de 203 nm, região do espectro difícil de se trabalhar por estar muito próxima ao "cut off" do solvente recomendado (metanol).
- b) a fraca absorvância dos tricotecenos no ultravioleta implica no uso de concentrações altas dos padrões, para execução da leitura no espectrofotômetro, (aproximadamente 100 ug/ml) quando comparadas com as necessárias para detecção por métodos cromatográficos.

Em face das desvantagens descritas optou-se por estabelecer a concentração de soluções estoque por diferença de massa do recipiente quando do seu preparo.

4.1.2 - Avaliação da pureza dos padrões de tricotecenos

A pureza dos tricotecenos é importante não só para a quantificação como para identificação qualitativa. Vários métodos podem ser utilizados para isto: ressonância nuclear magnética, cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia de massas, cromatografia gasosa, em camada delgada e espectrofotometria.

Foram escolhidos os métodos cromatográficos e espectrofotométrico, por serem os mais acessíveis. Os procedimentos estão descritos no item 3.5.2.

Os espectros de absorbância apresentaram um aspecto característico, com as absorbâncias aumentando em torno de 210 nm, chegando a um máximo em 205-203 nm para diacetoxiscirpenol e toxinas HT2 e T2. Nivalenol e deoxinivalenol não exibiram picos marcantes nos comprimentos de onda esperados de 220 e 219nm respectivamente. Nenhum dos padrões mostrou uma diminuição significativa da absorção após 210 nm. Assim estes espectros não serviram para avaliar conclusivamente a pureza dos padrões.

A cromatografia em camada delgada desenvolvida em placas comerciais de sílica gel e reveladas com ácido sulfúrico não demonstrou a presença de mistura de tricotecenos ou de outros compostos nos padrões cromatografados.

Os cromatogramas obtidos após a derivacão dos tricotecenos com heptafluorobutirilimidazol demonstraram que:

- 1 - o padrão de nivalenol continha uma impureza com tempo de retenção semelhante ao do HT2, sendo a relação entre as áreas do padrão e do contaminante em torno de 12:1
- 2 - o padrão de T2 tetraol possuía um contaminante com tempo de retenção semelhante ao do T2 triol, sendo a relação de áreas em torno de 5:1 aproximadamente.
- 3 - o padrão de T2 triol possuía um contaminante com tempo de retenção semelhante ao T2 tetraol, sendo a relação entre as áreas em torno de 10:1.

4.1.3 - Parâmetros que influenciam a derivação dos tricotecenos com heptafluorobutirilmidazol (HFBI).

Tomando-se como base o procedimento de Scott e colaboradores (1988) usando o HFBI para derivação de tricotecenos e cromatografia gasosa para quantificação, foram estudados os parâmetros descritos no item 3.5.3.

A proporção entre os solventes tolueno-acetonitrila originalmente empregada por Scott, 95 + 5, foi avaliada na tentativa de evitar o aparecimento de interferentes nos cromatogramas de padrões mais polares, como por exemplo, o T2 tetraol. O aumento da polaridade do meio de reação poderia facilitar a derivação, eliminando os picos decorrentes de derivação incompleta.

Verificou-se que proporções maiores de acetonitrila, ao contrário do esperado, diminuía as áreas dos picos de T2 tetraol e a derivação de outros padrões também ficava prejudicada. Atribuiu-se este fato a menor miscibilidade entre os reagentes pois ocorria a formação de uma película na superfície da solução.

O tempo de derivação de 30-40 minutos foi suficiente para tricotecenos menos hidroxilados, mas para os de peso molecular maior ou com maior número de posições hidroxiladas foi necessário no mínimo uma hora a temperatura de 60°C, para reação completa.

O aumento da relação HFBI:solvente resultou em cromatogramas "mais sujos" e portanto mais difíceis de serem interpretados sem que houvesse aumento das áreas dos padrões derivados. Uma relação menor que 1:10 mostrou ser insuficiente para misturas contendo mais que 5 ug de tricoteceno (T2 tetraol, T2 triol e nivale-nol) e acima de 10 ug para outros.

A lavagem de fase orgânica, após a derivação com diferentes soluções, não apresentou diferença quanto ao aspecto dos cromatogramas, porém optou-se pela solução de tampão fosfato pH 7,00. As seguintes condições foram estabelecidas como ótimas para derivação dos sete tricotecenos estudados:

- solvente: tolueno-acetonitrila (95 + 5)
- relação HFBI/solvente: 1:10
- temperatura de derivação: 60°C
- tempo de derivação: 60 minutos
- lavagem da fase orgânica após a derivação: tampão fosfato 0,1M pH 7.

4.1.4 - Condições cromatográficas para determinação de tricotecenos por cromatografia gasosa.

A escolha da fase estacionária foi feita baseada nos resultados obtidos por Scott e colaboradores (1986) durante a comparação do desempenho de cinco colunas para separação de cinco tricotecenos. Optou-se pela mais seletiva (25% cianopropilfenil e 75% dimetilsilano em fase ligada) e com menor comprimento e assim diminuir o tempo de análise.

O injetor do cromatógrafo, no modo "splitless", além de estar disponível no laboratório onde foi desenvolvido o trabalho, possuía a vantagem de ser o mais indicado para o trabalho quantitativo, juntamente com o sistema "on column", para este tipo de compostos, pertencentes a uma mesma família, com pontos de ebulição altos e relativamente próximos.

O detector por ionização em chama é comumente encontrado nos laboratórios nacionais que trabalham com análise de alimentos por tratar-se de um detector universal.

As condições experimentalmente determinadas para injeção de amostra (mistura de padrões) foram: temperatura do injetor, tempo de abertura da válvula para obtenção de condição "splitless" fluxo de limpeza do injetor e injeção com e sem efeito do solvente.

Diferentes programações de coluna foram estudadas, sempre considerando a resolução dos compostos e o tempo de análise. A vazão do gás de arraste foi também otimizada. Dentre as determinações experimentais as que melhor se adequaram aos objetivos foram:

- programação de temperatura da coluna: 100°C durante um minuto, aumento a 20°C/minuto até 155°C, permanecendo cinco minutos, aumento até 220°C, permanecendo 40 minutos.
- temperatura do injetor: 275°C
- temperatura do detector: 300°C
- tempo de abertura da válvula: 0,75 minutos
- fluxo de limpeza do injetor: 25 ml/minuto
- vazão de gás de arraste (hidrogênio): 4 ml/minuto.

Estas condições foram utilizadas durante a triagem, confirmação e quantificação de tricotecenos em amostras de trigo, cujos resultados estão descritos adiante.

4.1.5 - Determinação dos tempos de retenção relativos (r_{pi}) dos tricotecenos com relação a um padrão interno.

Empregando-se as condições de derivação definidas no item 3.5.3 e as condições cromatográficas acima descritas, determinaram-se os tempos de retenção ajustados (t'_R) com relação ao solvente, dos padrões de diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol, toxina HT2, nivalenol, toxina T2, T2 tetraol e T2 triol. A ordem de eluição pode ser observada na Tabela B.

Os tempos de retenção relativos (r_{pi}) foram determinados em relação a um padrão interno, o metil araquidato. Pela Tabela B pode-se verificar que os tempos de retenção ajustados dos padrões apresentaram desvios padrão altos, principalmente para tricotecenos que eluíam nas mudanças de temperatura da programação (deoxinivalenol, nivalenol). Atribuiu-se estas variações a problemas verificados com a válvula controladora de pressão da coluna.

Para minimizar o efeito das variações nos tempos de retenção empregou-se o padrão interno o que veio contornar o problema de performance do equipamento e da mudança normal da viscosidade do gás, tornando mais fácil a identificação dos picos de tricotecenos que viessem estar presentes nas amostras.

Tabela 8 - Tempos de retenção ajustados (t'_R) dos tricotecenos heptafluorobutilados e tempos de retenção relativos (r_{pi}) com relação ao metil araquidato.

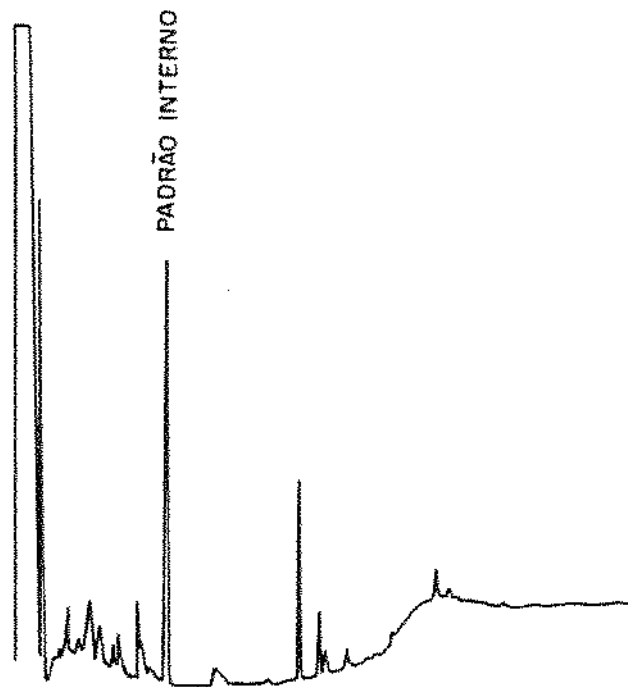
Padrão	t'_R (minutos)	r_{pi}
DON	5,44 ± 0,39	0,64 ± 0,01
NIV	13,25 ± 0,85	1,48 ± 0,07
T2 tetraol	14,02 ± 0,44	1,74 ± 0,06
T2 triol	20,25 ± 0,31	2,44 ± 0,11
DAS	22,73 ± 0,16	2,84 ± 0,03
HT2	26,79 ± 0,66	3,34 ± 0,06
T2	36,50 ± 0,25	4,50 ± 0,01

A Figura 5 mostra dois cromatogramas, um que representa o branco dos reagentes de derivação e outro apresenta os sete padrões de tricotecenos estudados, derivados e cromatografados nas condições estabelecidas. Pode se verificar que apenas o deoxinivalenol tem tempo de retenção menor que o padrão interno e que todos os picos estão bem resolvidos.

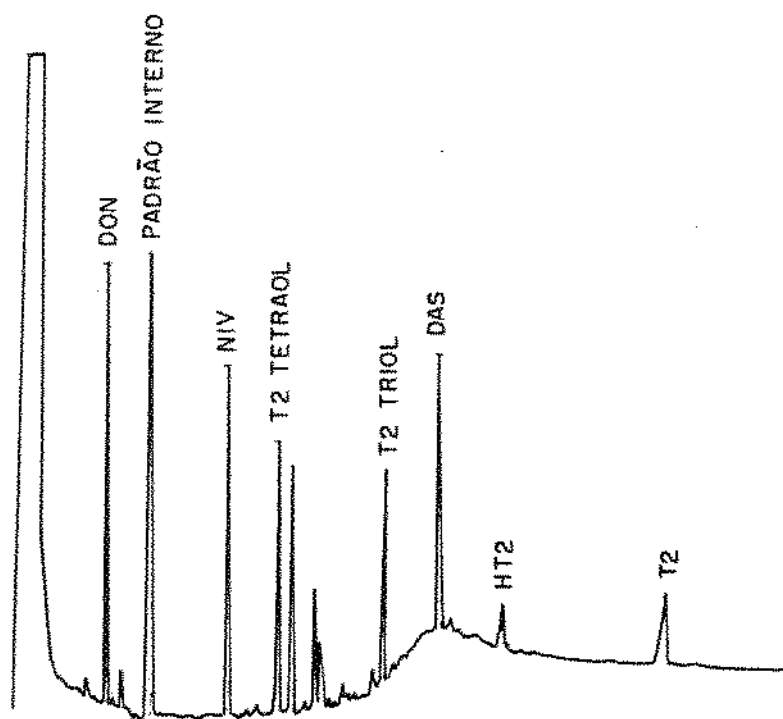
4.1.6 - Quantificação dos tricotecenos

Inicialmente foi experimentada a quantificação por padronização externa. Neste procedimento é necessário que não ocorram variações de fluxo e de sinal elétrico no detector e no integrador, além das demais condições de procedimento que devem ser mantidas constantes. A dificuldade de se conseguir na prática estas condições, levou-nos a experimentar um padrão interno, o metil araquidato, para diminuir as variações encontradas através de cálculos de áreas dos picos.

A prática demonstrou que as curvas apresentavam diferentes inclinações a cada dia (Figura 6). Estas diferenças demonstravam que a relação das áreas do padrão interno e dos padrões de tricotecenos não foi constante. Tal variação indica que houve alterações na tensão da rede que influenciaram as respostas do detector.



1 : branco para derivação



2 : mistura de padroes de tricotecenos

Fig.5 : Perfil cromatografico de separação de tricotecenos
 1. branco para derivação
 2. mistura de padrões de tricotecenos

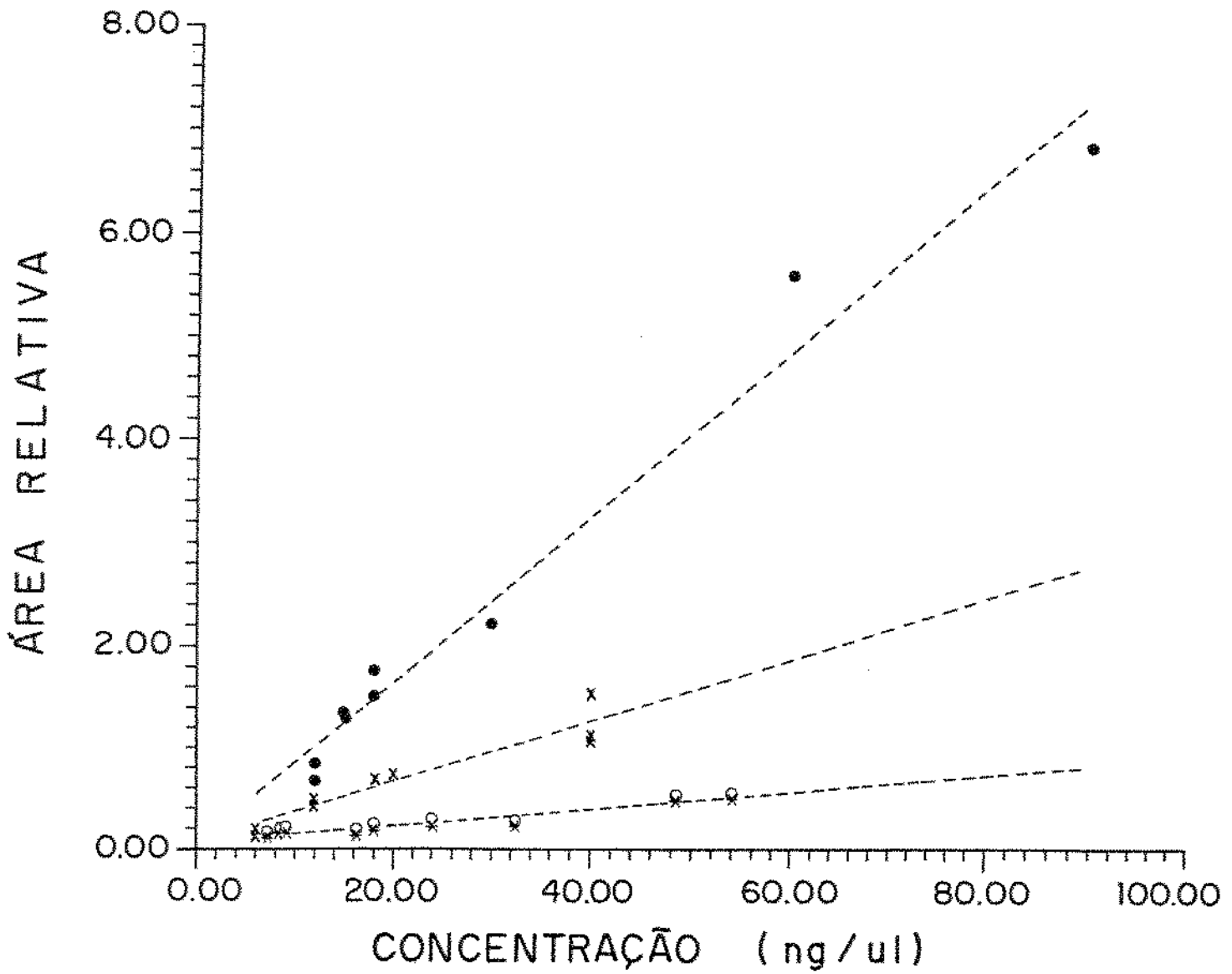


Fig. 6 Curvas padrão de toxina T2 .

A relação concentração x área relativa era linear numa dada faixa e o cálculo dos limites de confiança das retas apresentava um intervalo comum para cada padrão de tricoteceno.

Optou-se por utilizar padrão interno para o aspecto quantitativo. Durante a quantificação continuou sendo utilizada a razão entre as áreas de cada tricoteceno e a área do padrão interno. Porém esta relação foi estabelecida diariamente.

4.1.7 - Extração e limpeza.

Para escolha do método mais adequado para extração e limpeza de amostras de trigo para determinação de tricotecenos, dois procedimentos, por cromatografia em camada delgada foram examinados devido a sua simplicidade e baixo custo:

- a) o método descrito por Soares (1987) para determinação de aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina e zearalenona;
- b) o método de Marochi (1988) para determinação de tricotecenos.

Os efeitos das modificações feitas nestes métodos foram avaliados por cromatografia de camada delgada e cromatografia gasosa.

As modificações experimentadas no procedimento de Marochi usando camada delgada foram: uso ou não de hexano para desengordurar o extrato; clarificação com gel férrico, carvão ativo e carbonato de cobre passando e não passando posteriormente por minicoluna de Celite:alumina nas proporções de 0,7:0,3 e 1:0,5g, eluindo o tricoteceno com clorofórmio.

No procedimento de Soares as modificações avaliadas por camada delgada foram: limpeza do extrato obtido após partição em minicoluna de carvão ativo:Celite:alumina (0,7:0,3:0,5) eluindo com cloroformio; clarificação com sulfato de amônio(30%), carbonato de cobre e carvão ativo passando e não passando ao final da limpeza por minicoluna de Celite:alumina nas proporções do caso anterior.

As avaliações em camada delgada das modificações introduzidas demonstraram que o método proposto para determinação das outras micotoxinas, em qualquer caso ainda mostrava muitos co-extrativos.

Por cromatografia gasosa usando colunas SE 54 e DB 225, avaliou-se o procedimento de Soares (1987) com introdução ou não de minicoluna na etapa de limpeza e o procedimento de Marochi (1988) com e sem desengorduramento.

Os resultados demonstraram a impossibilidade de transposição da técnica de Marochi, para cromatografia gasosa, uma vez que a limpeza foi insuficiente e os extratos produziram cromatogramas extremamente sujos, como se pode ver pela Figura 7. Uma possível explicação para este fato pode estar no uso de gel férrico e carbonato cúprico durante a clarificação, pois a presença de metais mesmo em quantidades mínimas pode alterar o comportamento de interferentes.

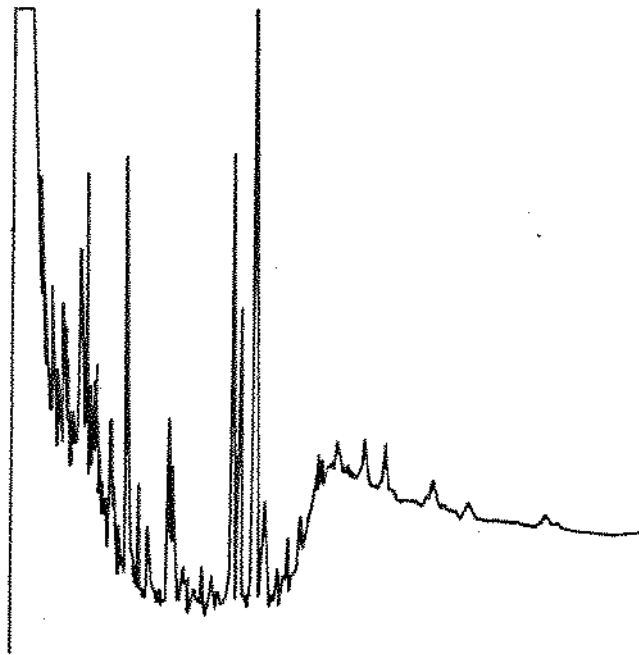
A extração e limpeza preconizadas no método de Soares acrescida de uma etapa de limpeza em minicoluna mostrou-se adequada com cromatogramas limpos em amplificações da ordem de 10^{-12} no cromatografo gasoso (Figura 7).

4.2 - Avaliação da metodologia proposta.

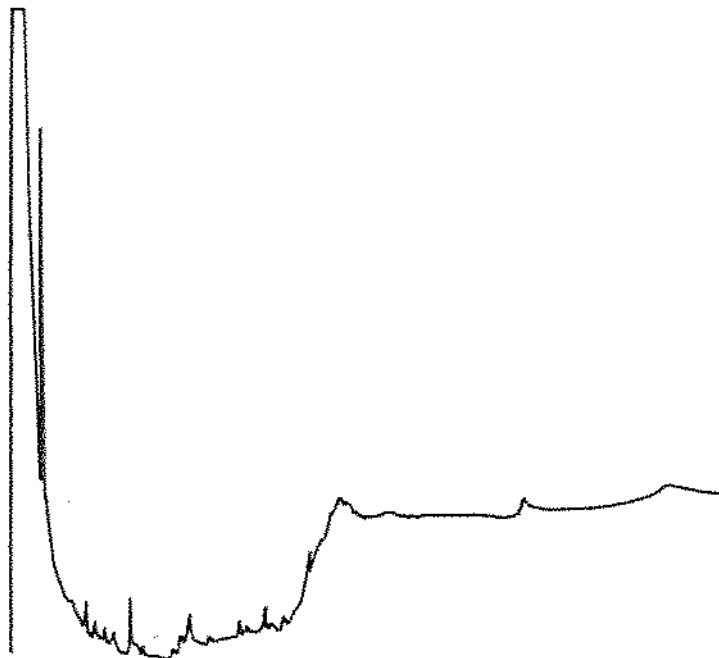
4.2.1 - Teste de rusticidade

Durante a otimização do procedimento para determinação de tricotecenos em amostras de trigo, observou-se que as etapas críticas para o processo quantitativo eram a limpeza em minicoluna e a derivacão da toxina para cromatografia gasosa.

Tendo em vista o custo das análises e o tempo necessário para efetua-las utilizou-se um plano fatorial fracionário para testar algumas etapas para o teste de rusticidade (Wernimont, 1985). Foram montadas combinações de sete fatores, que os experimentos anteriores haviam demonstrado serem pontos críticos. Assim foram executados oito experimentos para cada padrão, sendo um do grupo A e outro do grupo B como descrito em 3.6.1.



1: método de Marochi



2: método de Soares com mini-coluna

Fig. 7 : Sistemas de extração clarificação e limpeza de amostras e seus perfis cromatograficos.

Os efeitos dessas combinações nas porcentagens de recuperação dos padrões estão na Tabela 9.

Tabela 9 - Porcentagens de diacetoxiscirpenol(DAS) e nivalenol (NIV) recuperadas e diferenças nas combinações de condições durante o teste de rusticidade.

Condição	Combinações	% DAS recuperado	Diferença	%NIV recuperado	Diferença
Solvente	clorofórmio	59,5	-13,7	66,7	- 9,9
	tol-aceton.	73,3		76,6	
To.secagem	aquecimento	59,2	-14,3	66,9	- 9,3
	ambiente	73,5		76,3	
Vol.eluição	30 ml	61,8	- 8,8	70,8	- 1,6
	40 ml	70,7		72,4	
Vazão da col.	gravidade	61,8	- 9,2	67,9	- 7,3
	pressionando	71,0		75,3	
HFBI	novo	72,6	12,5	74,7	6,2
	c/+30 dias	60,2		68,5	
Empacotamento da coluna	rolando	74,8	16,9	72,5	1,8
	pressionando	57,9		70,7	
Tempo de derivação	60 minutos	72,10	11,44	71,9	0,5
	90 minutos	60,7		71,4	

Os resultados mostram que todos os efeitos experimentados influenciam sobre os teores recuperados dos dois padrões estudados e que o diacetoxiscirpenol é o mais susceptível a variações de procedimento do que o nivalenol.

As condições denominadas básicas para tempo de derivação, empacotamento da coluna e "idade" do reagente mostraram-se as mais adequadas para a determinação de tricotecenos do grupo A ou B (3.6.1).

A vazão da coluna com pressão do embolo melhorou o rendimento para as duas toxinas testadas, mas, isto além de não reprodutível apresentava cromatogramas muito sujo dificultando a identificação e quantificação mesmo para as misturas de padrões.

O volume de eluição e a temperatura de secagem e o solvente empregado na eluição, foram as condições alternativas que mais influenciaram nos teores de micotoxinas recuperados.

Com base neste teste foram escolhidas as condições para extração, limpeza e derivação descritas na forma final do método, em 3.7.

4.2.2 - Recuperação

Estabelecido o procedimento, foi realizado um teste de recuperação em sete níveis, para diacetoxiscirpenol e nivalenol eluídos da minicoluna com clorofórmio e tolueno-acetonitrila (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 - Recuperação de Diacetoxiscirpenol

Eluição com clorofórmio			Eluição com tolueno-acetonitrila		
Adição (mg/Kg)	Detectado (mg/Kg)	%Recuperação	Adição (mg/Kg)	Detectado (mg/Kg)	%Recuperação
0,711	0,619	87.5	0,448	0,391	87.3
1,423	0,896	63.0	0,737	0,601	81.5
1,778	1,193	67.1	1,046	0,867	82.9
2,134	1,288	60.3	1,195	1,099	91.9
2,846	1,780	62.6	1,494	1,395	93.4
3,557	1,812	50.9	1,793	1,534	85.6
4,267	1,767	41.3	2,241	2,174	97.1

Tabela 11 - Recuperação de Nivalenol

Eluição com clorofórmio			Eluição com tolueno-acetonitrila		
Adição (mg/Kg)	Detectado (mg/Kg)	%Recuperação	Adição (mg/Kg)	Detectado (mg/Kg)	%Recuperação
0,655	0,469	71.7	0,36	0,296	82.1
0,982	0,578	58.0	0,576	0,618	107.3
1,142	0,663	57.1	0,720	0,626	86.9
1,309	0,418	32.3	0,864	0,782	90.6
1,636	0,828	50.6	1,080	1,052	97.4
1,964	0,816	41.9	1,152	1,075	92.5
2,290	0,821	35.8	1,296	1,210	92.3

Em ambos os tricotecenos pode-se verificar que a faixa de recuperação foi ampliada na eluição com tolueno-acetonitrila. A recuperação de diacetoxiscirpenol entre 0,45 e 2,3 mg/Kg apresentou, na eluição com tolueno-acetonitrila um valor médio de 88,5% contra 61,8% entre 0,7 e 4,3 mg/Kg na eluição com clorofórmio. O coeficiente de variação passou de 21,5% no primeiro caso, para 6,0% no segundo caso. O nivalenol, entre 0,45 e 1,3 mg/Kg de adição eluído com a tolueno-acetonitrila, apresentou um valor médio de recuperação de 92,7% contra 49,6% quando clorofórmio foi empregado como solvente no intervalo de 0,65 e 2,3 mg/Kg de adição. Os coeficientes de variação das recuperações nos sete níveis foram 26 e 8 para eluição com clorofórmio e tolueno-acetonitrila, respectivamente.

4.2.3 - Repetibilidade das amostras contaminadas artificial e naturalmente

A repetibilidade foi testada em amostras artificialmente contaminadas com T2 tetraol, DAS, T2 triol, DDN, NIV e toxina T2 de acordo com procedimento descrito em 3.6.3. Foi utilizada uma média de seis determinações (Tabela 12).

A repetibilidade das amostras naturalmente contaminadas durante os levantamentos, descritos mais adiante, foi calculada a partir dos valores obtidos das replicatas (Tabela 12).

Os valores obtidos para verificação da repetibilidade nas amostras natural e artificialmente contaminadas estão na Tabela 11 como coeficientes de variação. Pode-se verificar que estão na faixa de 3 a 13% para as micotoxinas encontradas como contaminantes naturais. O tricotecenos diacetoxiscirpenol e toxina T2 apresentaram os menores coeficiente de variação.

O coeficiente de variação de diacetoxiscirpenol nas amostras artificialmente contaminadas foi em torno 2,6 vezes maior que o encontrado no caso de contaminação natural. O que pode indicar que o número de determinações no caso de contaminação natural não foi suficiente para revelar a variabilidade que pode ser encontrada com este método para esta toxina. Nas demais toxinas as variações foram pequenas entre os resultados de amostras naturais e artificiais, pois o número de amostras contaminadas com elas era maior.

Quando comparados estes resultados com os coeficientes de variação mencionados na literatura, eles estão entre os valores mais baixos das faixas mencionadas quando é empregada cromatografia gasosa/detector por ionização na determinação (2,3 a 30) (Ilus et alii, 1981; Collins & Rosen, 1981).

Tabela 12 - Repetibilidade das amostras natural e artificialmente contaminadas.

Micotoxinas	Coeficiente de variação médio (%)	
	Contaminação natural	Amostras fortificadas
DAS	2,8	7,3
DON	11,7	11,5
NIV	12,9	8,7
T2	3,9	----
T2 Tetraol	7,3	4,6
T2 Triol	----	11,9

4.2.4. Limites de detecção de tricotecenos

Os limites de detecção dos padrões de tricotecenos foram determinados diminuindo as concentrações até atingir um ponto onde o sinal obtido fosse três vezes maior que ruído. Foram empregados o desvio padrão das menores áreas detectadas, e o procedimento estatístico descrito por Calcutt & Body (1986), para calcular os limites de detecção do método com 95% de confiança (Tabela 13).

Os limites de detecção nas amostras variaram para os tricotecenos do grupo A de 0,1 a 0,5 mg/kg de amostra e de 0,1 a 0,2 mg/kg de amostra para os tricotecenos do grupo B. Estes valores concordam com os obtidos por outros autores que usaram determinação por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (Romer, 1984).

Tabela 13 - Limites de detecção do método proposto para determinação de tricotecenos

Tricoteceno	Padrão inj. (ng)	Amostra (mg/kg)
DAS	3,5	0,1
DON	7,0	0,2
HT2	12,0	0,5
NIV	2,0	0,1
T2	2,0	0,1
T2 Tetraol	8,0	0,4
T2 Triol	6,0	0,3

4.3 - Procedimento para confirmação de identidade

A confirmação de um resultado cromatográfico pode ser executada ou por reações químicas ou por métodos físicos do tipo espectrofotometria no infravermelho ou espectrometria de massas.

Diante da dificuldade de acesso a um espectrômetro de massas, dificuldade esta comum a muitos laboratórios nacionais, decidiu-se avaliar reações químicas que aliassem simplicidade de execução e baixo custo e que permitissem estabelecer as identidades dos compostos.

4.3.1 - Acetilação

A acetilação empregada em tricotecenos do grupo A e B teve lugar em meio anidrido-acético:piridina. Quando a acetilação é completa HT2, T2 triol e toxina T2 formam o mesmo composto.

Com acetilação o diacetoxiscirpenol mostrou uma pequena variação no seu tempo de retenção relativo comparativamente ao encontrado antes da reação. Toxina HT2 e T2 triol podiam apresentar picos com maiores tempos de retenção por derivação incompleta e igual ao da toxina T2 após reação completa. Nivalenol e deoxinivalenol acetilados exibiram seus tempos de retenção relativos aumentados com relação aos compostos originais (Tabela 14).

4.3.2 - Hidrólise

A hidrólise em meio de amônia:metanol transforma os tricotecenos do grupo A nos alcoóis correspondentes. Assim o diacetoxiscirpenol resultava no escirpentriol e os demais T2 triol e toxinas T2 e HT2 transformam-se em T2 tetraol.

Com a hidrólise, o tempo de retenção relativo (r_{ip}) do diacetoxiscirpenol hidrolizado e derivado com HFBI diminuiu. Os demais tricotecenos do grupo A mostraram comportamento cromatográfico semelhante ao T2 tetraol derivado com HFBI. A exceção foi a toxina T2 que apresentou comportamento semelhante ao HT2 heptafluorobutirado (Tabela 14).

4.3.3 - Redução

A redução com boridreto de sódio transforma o grupamento cetônico dos tricotecenos do grupo B em alcoóis.

A reação provocou diminuição nos tempos de retenção do deoxinivalenol e nivalenol derivados com relação ao original não reduzido.

Os resultados das reações nos padrões de tricotecenos foram verificados pelas mudanças nos tempos de retenção relativos observados nestes compostos derivados com HFBI (Tabelas 8 e 14).

Tabela 14 - Tempos de retenção relativos (r_{pi}) dos tricotecenos (a) após reações de derivação (b).

Padrões	Acetilacão	Hidrólise	Redução
DON	2,30 ± 0,074	-----	0,71 ± 0,02
NIV	3,41 ± 0,029	-----	0,50 ± 0,02
T2 tetraol	3,35 ± 0,079 ⁽⁵⁾	1,73 ± 0,05	-----
T2 triol	2,9 ⁽⁴⁾ ; 3,9; 4,5	1,76 ± 0,023	-----
DAS	3,02 ± 0,02	0,51 0,59 1,87	-----
HT2	4,3 ± 0,19	1,76 ± 0,035	-----
T2	4,27 ± 0,18	2,83 ± 0,04	-----

(a) com relação a metil araquidato

(b) após reação de derivação a mistura era exposta ao HFBI

As observações do comportamento dos padrões submetidos ao sistema proposto, confirmaram o que se esperava, com base nas modificações das estruturas originais dos tricotecenos submetidos às reações descritas:

- 1) aumento dos tempos de retenção relativos para os tricoteceno após a acetilação, uma vez que ficavam menos posições com hidroxilas livres para serem substituídas pelo HFBI, portanto com pontos de ebulição mais altos.
- 2) os tricotecenos do grupo A quando submetidos a hidrólise completa apresentariam tempos de retenção relativos iguais aos do T2 tetraol, com excessão do diacetoxiscirpenol.
- 3) diminuição dos tempos de retenção relativos dos tricotecenos do grupo B, pois a redução do grupo cetônico da posição 8 resultaria num derivado com uma hidroxila a mais para ser substituída por HFBI.

Após a triagem das amostras extraídas, limpas, derivadas e cromatografadas pelo procedimento proposto, efetuou-se a fortificação das amostras suspeitas com padrões de tricotecenos derivados separadamente para este fim.

O parâmetro, neste caso, é o aumento na área do pico suspeito, porém este fato não é conclusivo, porque outros compostos que não tricotecenos podem tem comportamento cromatográfico semelhante. O aparecimento de pico próximo ao suspeito pode-se considerar como conclusivo de não contaminação.

As Figuras 8, 9 e 10 mostram respectivamente cromatogramas de uma amostra não contaminada, uma amostra suspeita de contaminação com diacetoxiscirpenol e sua confirmação e de uma amostra suspeita de contaminação simultânea de deoxinivalenol e nivalenol e sua confirmação, pelo sistema de reações químicas estabelecido.

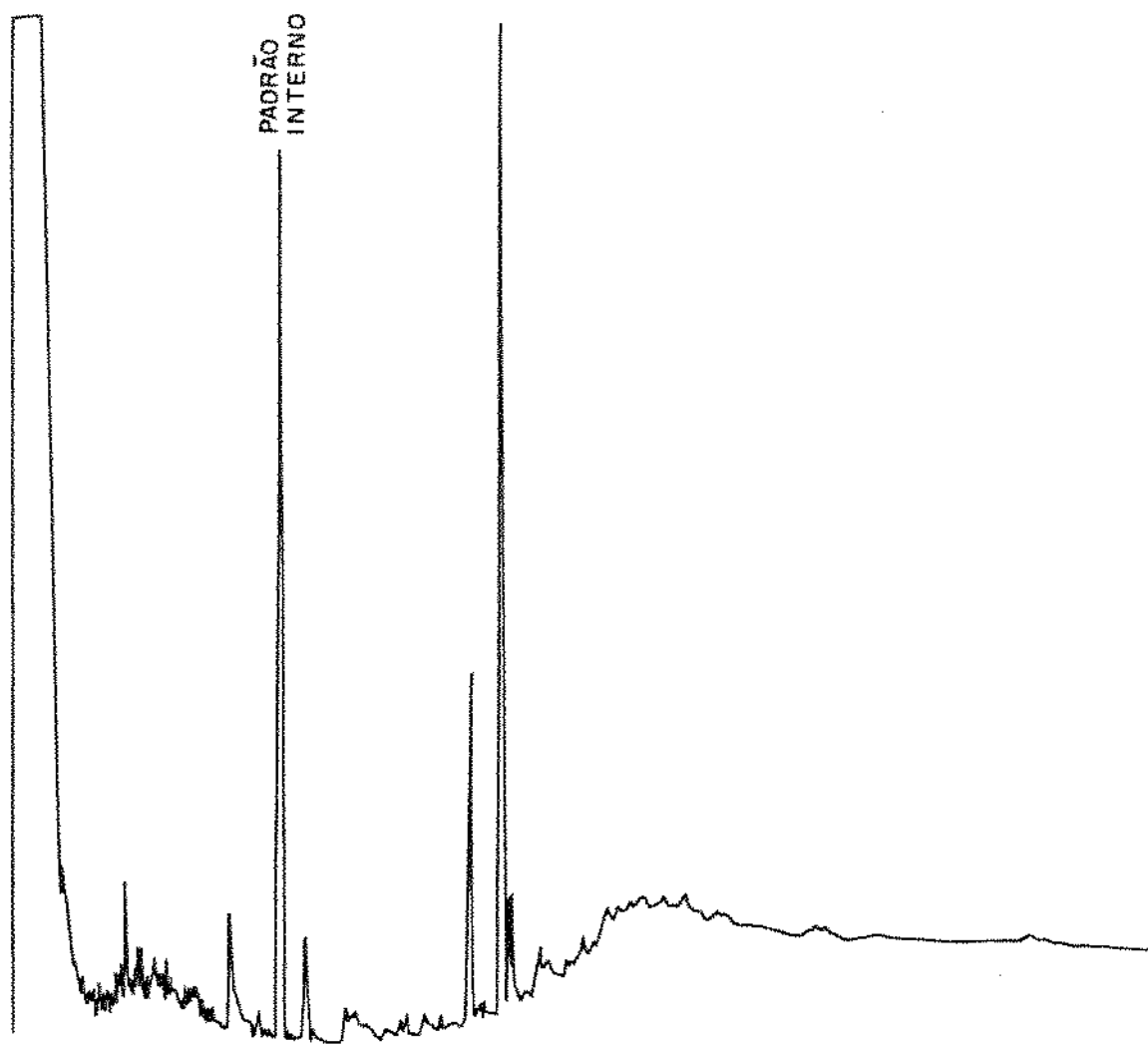


Fig. 8 Amostra não contaminada

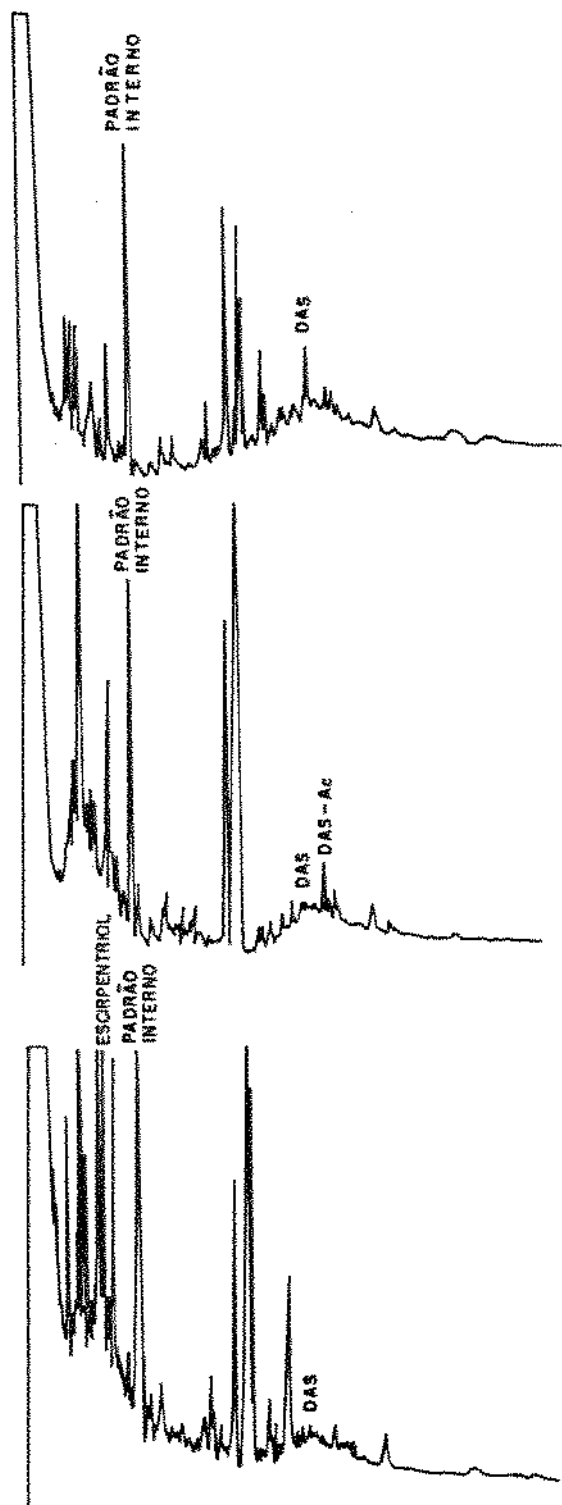


Fig. 9 Amostra presuntiva de contaminação com DAS e sua confirmação .

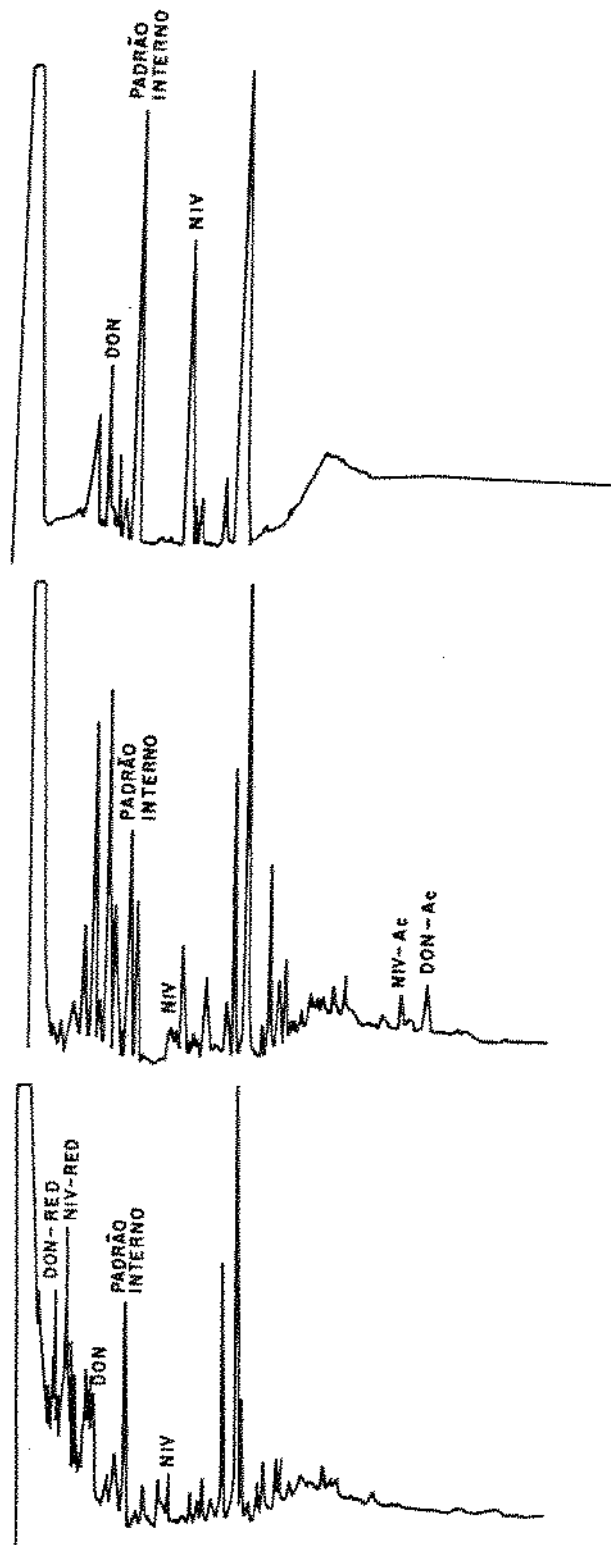


Fig.10 : Amostra presuntiva de contaminação com DON e NIV sua confirmação

4.4 - Incidência de tricotecenos e outras micotoxinas nos campos experimentais do Estado de São Paulo

As amostras empregadas pertenciam a duas variedades de trigo BH 1146 e IAC 24. Foram colhidas nos campos experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), conforme o mencionado no item 3.3.1.

O uso de mais de uma variedade nos vários locais é interessante porque em cada campo de cultivo variáveis, tais como: umidade relativa, índice pluviométrico e temperatura, são as mesmas. Porém, o comportamento de cada variedade frente à contaminação por fungos e a produção das micotoxinas pode se mostrar diferente.

Segundo Barros et alii (1982) e Mota (1982) a triticultura paulista estava distribuída em duas regiões, a região sul, abaixo do paralelo 24 e a região do vale do Paranapanema. Esta última concentrava então 90% da produção do Estado. A região abaixo do paralelo 24 era reconhecida como a mais úmida e sujeita a epidemias mais severas. Atualmente o trigo pode ser encontrado em outras regiões como Campinas. Outras estão sendo avaliadas para possível expansão das áreas de plantio de trigo.

4.4.1 - Aspecto do Trigo

Os grãos de trigo que constituíam as amostras foram primeiramente avaliados quanto ao seu aspecto.

A avaliação de grãos sob luz ultravioleta funciona como um indicativo de contaminação por micotoxinas fluorescente, por exemplo aflatoxinas (Shotwell, 1986). No caso de contaminação por tricotecenos os grãos podem, entre outras características, apresentar sintomas típicos de contaminação por Fusarium, ou seja, grãos chochos, de aspecto rosado e/ou esbranquiçados, com redução do peso específico e esfarelamento sob leve pressão (Barros, 1985; Banchemo et alii, 1987).

Nenhuma amostra apresentou fluorescência quando observada sob luz ultra-violeta. As amostras BH 1146 de Cândido Mota, BH 1146 e IAC 24 de Itararé apresentaram em média 20% de grãos murchos, esverdeados e alguns mofados. A amostra IAC 24 de Monte Alegre do Sul apresentou grãos com pontas pretas e em torno de 3% de grãos murchos.

As demais amostras apresentaram aspecto normal, grãos amarelos e inteiros, sendo que algumas apresentaram grãos mais escuros, mas com aparência normal, sem pontos pretos ou falhas. Atribuiu-se estes pequenos defeitos ao efeitos de secagem dos grãos previamente ao armazenamento.

4.4.2 - Incidência de tricotecenos

As amostras foram submetidas a triagem de acordo com o procedimento descrito no item 3.7 e submetidas a confirmação de acordo com o item 3.8. A quantificação foi feita por padronização interna.

Os resultados de triagem e confirmação (Tabela 15) demonstraram que seis amostras estavam contaminadas, sendo quatro pertencentes a variedade IAC 24 e duas a BH 1146.

Tabela 15 - Incidência de tricotecenos em trigo cultivado em estações experimentais do Estado de São Paulo.

Local de Plantio	Variedade de trigo			
	IAC-24		BH-146	
	Tricoteceno	teor (mg/kg)	Tricoteceno	teor (mg/kg)
Campinas	N.D.		N.D.	
Cândido Mota	N.D.		DON	0,47
			NIV	0,16
Cruzália	DAS	0,60	N.D.	
	T2	0,40		
Florínea	N.D.		N.D.	
Itararé	DON	0,58	T2	0,80
	NIV	0,20		
Mococa	N.D.		N.D.	
Monte Alegre do Sul	DON	0,59	N.D.	
Pindorama	N.D.		N.D.	
São José das Laranjeiras	DON	0,56	N.D.	
	NIV	0,40		
Tietê	N.D.		N.D.	

*Média de 3 determinações
N.D. = Não detectado.

Os resultados indicaram problemas de contaminação nas regiões tradicionais de plantio de trigo. As novas áreas (Campinas, Mococa, Pindorama, Tietê) não apresentaram amostras contami-

nadas. Na região de Monte Alegre do Sul, a variedade IAC 24 apresentou deoxinivalenol, porém, em níveis baixos. Tais observações constituem uma indicação favorável a utilização crescente das áreas não tradicionais.

As observações são poucas para se concluir a respeito da susceptibilidade das variedades estudadas, porém a análise de regressão das variáveis, descrita mais a frente, permite avaliar melhor os resultados.

O deoxinivalenol é a micotoxina que aparece com maior frequência contaminando grãos de trigo e seus subprodutos, em muitos países. Nas amostras examinadas este foi também o caso. A faixa dos níveis de contaminação relatadas na literatura são muito amplas (entre 0,041 e 9 mg/Kg) dependendo do tipo e origem da amostra e do método analítico empregado na determinação. Co-contaminações com outros tricotecenos e outras micotoxinas tais como: nivalenol, toxina T2 e diacetoxiscirpenol, zearalenona e moniliformina, etc também são bastante frequentes (Lee et alii, 1985; Tanaka et alii, 1985; Ueno, 1986; Scott, 1988; Jelinek et alii, 1989; Sydenham et alii, 1990).

As outras micotoxinas, em ordem crescente de frequência, também aparecem de acordo com a literatura: nivalenol, toxina T2 e diacetoxiscirpenol.

Similarmente ao observado no Japão, três regiões do estado de São Paulo apresentaram co-contaminação por deoxinivalenol e nivalenol. Na América do Norte tal associação tem-se mostrado rara.

Sob o ponto de vista da legislação em outros países, as amostras contaminadas por deoxinivalenol seriam rejeitadas, na Romênia e na antiga União Soviética. Para os demais tricotecenos não existe legislação proposta; apenas na antiga União Soviética para a toxina T2 (0,1 mg/Kg) e a amostra contaminada estaria acima do aceitável.

4.4.3 - Dados climatológicos

Os dados climatológicos das estações experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas estão na tabela 16. As estações de Cândido Mota, Cruzália, Florínea e São José das Laranjeiras não

possuem estações meteorológicas. Para estas foram usados os dados de Assis. As estações de Assis e Pindorama não dispunham dos valores de umidades relativas do ano de 1990.

Tabela 16 - Dados climatológicos das estações experimentais do Instituto Agronômico de Campinas: precipitação pluviométrica (mm H₂O); temperatura média (°C) e umidade relativa (XUR) no período de abril a outubro 1990.

Localidade		Mês						
		Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
Tietê	mmH ₂ O	21,4	48,8	21,8	134,5	44,6	50,9	89,2
	Temperatura Média (°C)	23,0	17,8	16,6	15,8	17,3	18,0	22,8
	XUR	79,2	80,2	78,2	80,9	75,5	74,9	72,1
Campinas	mmH ₂ O	25,5	18,8	45,3	139,1	26,7	55,0	32,6
	Temperatura Média (°C)	23,1	18,3	17,2	16,5	17,9	18,4	22,4
	XUR	76,7	77,7	74,9	76,3	71,4	71,0	70,9
Monte Alegre do Sul	mmH ₂ O	80,7	68,8	9,4	101,1	66,3	62,3	111,6
	Temperatura Média (°C)	21,3	17,0	15,9	15,3	16,8	17,3	21,3
	XUR	80,3	79,6	74,8	77,8	73,7	73,0	73,0
Mococa	mmH ₂ O	39,3	66,4	0,0	13,9	104,3	50,8	114,9
	Temperatura Média (°C)	23,1	19,6	18,1	18,2	19,9	20,4	23,8
	XUR	75,9	75,0	69,2	68,2	66,1	65,4	67,7
Pindorama	mmH ₂ O	86,9	76,6	2,4	30,0	75,8	48,6	45,1
	Temperatura Média (°C)	23,5	19,3	18,4	18,1	19,9	19,9	24,3
	XUR	----	----	----	----	----	----	----
Assis*	mmH ₂ O	43,2	52,3	25,0	97,9	62,1	108,9	83,2
	Temperatura Média (°C)	23,4	17,7	17,4	16,1	18,2	18,3	23,3
	XUR	----	----	----	----	----	----	----
Itararé	mmH ₂ O	94,3	86,1	47,0	170,5	107,3	139,9	149,8
	Temperatura Média (°C)	18,4	13,5	12,7	11,1	12,9	13,1	17,4
	XUR	86,3	82,1	98,0	89,0	79,1	82,3	82,3

*A estação meteorológica de Assis é a mais próxima das localidades de São José das Laranjeiras, Cruzália, Florínea e Cândido Mota.

Numa observação a grosso modo não parece haver diferença entre os dados climatológicos das várias estações experimentais que justifiquem a contaminação encontrada. Exceto no caso de Itararé onde estes dados são evidentemente diferentes das outras estações e onde as duas variedades apresentaram contaminação.

4.4.4 - Microbiota fúngica

O exame fitossanitário de sementes de trigo foram executados pelas pesquisadoras Célia de Campos Lasca e Elizabete Y. Kohara, do Instituto Biológico de São Paulo, SP. A identificação foi feita considerando as características das frutificações (forma, cor, inserção de esporos, etc) e exames de lâminas ao microscópio composto.

Os fungos predominantes nas sementes foram: Alternaria, Epicoccum, Cladosporium e Drechslera. As porcentagens de fungos produtores de tricotecenos detectados nas amostras estão nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Porcentagens de fungos relatados como produtores de tricotecenos encontrados na variedade BH1146.

Espécie de <u>Fusarium</u>	Localidade									
	Campinas	Candido Nota	Cruzália	Florinea	Itararé	Mococa	Monte Alegre do Sul	Pindorama	São José das Laranjeiras	Tiete
<u>Cochaloseorium</u>	—	—	—	—	14,5	—	—	—	—	—
<u>E. voluiforme</u>	—	4,0	5,5	3,0	7,5	2,0	—	0,5	0,5	2,5
<u>E. semitectum</u>	1,5	0,5	1,5	1,5	4,0	4,0	—	3,5	2,0	1,0
<u>E. equiseti</u>	—	—	—	—	4,0	—	—	—	—	0,5
<u>E. solani</u>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,5
<u>Fusarium sp</u>	0,5	0,5	0,5	1	33	0,5	—	0,5	3,0	2,0
<u>Gonatotriches sp</u>	10	10	21	2,5	—	—	7,5	—	—	—
<u>Trichothecium sp</u>	—	0,5	—	—	20	—	—	1,0	—	—

Tabela 18 - Porcentagens de fungos relatados como produtores de tricotecenos encontrados na variedade IAC24.

Espécie de <u>Fusarium</u>	Localidade									
	Campos	Candido Nota	Cruzália	Florinea	Itararé	Mococa	Monte Alegre do Sul	Pindorama	São José das Laranjeiras	Tiete
<u>Cephalosporium</u>	—	—	—	—	3,0	—	—	0,5	0,5	—
<u>F. moniliforme</u>	3,5	0,0	10,5	15,5	2,5	8,0	2,3	24,5	4,5	—
<u>F. semitectum</u>	0,5	1,5	1,5	—	1,5	4,0	1,5	—	1,0	1,5
<u>F. equiseti</u>	—	—	—	—	—	0,5	—	—	—	—
<u>F. solani</u>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<u>Fusarium sp</u>	—	0,5	0,5	—	3,0	—	1,5	1,0	0,5	—
<u>Gonatoschrys se</u>	5,5	7,5	35,5	0,5	2,0	6,0	—	—	3,0	1,5
<u>Trichothecium se</u>	—	—	—	—	—	2,5	3,5	24,5	—	0,5

Até o momento tem sido aceito que Fusarium moniliforme não é capaz de produzir tricotecenos (Mirocha et alii, 1990). Ao somarmos os teores de infecção por Fusarium excluindo o Fusarium moniliforme, não parece haver diferença que justifique o aparecimento de contaminação em algumas amostras e outras não.

4.4.5 - Incidência de outras micotoxinas

A triagem e quantificação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, esterigmatocistina, ocratoxina A e zearalenona foi realizada empregando cromatografia em camada delgada, conforme o descrito no item 3.4.

Durante a triagem amostras apresentaram resultados presuntivos positivos. O procedimento de confirmação mostrou apenas três amostras contaminadas com zearalenona (tabela 19)

Tabela 19 - Outras micotoxinas presentes nas amostras do Estado de São Paulo.

Amostras contaminadas		Micotoxina encontrada e
Variedade	Localidade	teor (mg/kg)
IAC-24	Itararé	ZEA 0,21
IAC-24	São José das Laranjeiras	ZEA 0,13
BH-146	Itararé	ZEA 0,04

Não existe limite de tolerância para estas micotoxinas na legislação nacional. Existe apenas uma proposta de limite feita pelo Grupo de Micotoxinas, cerca de 200 ug/kg. Neste caso apenas a amostra BH 1146 de Itararé estaria pouco acima do limite.

4.4.6 - Avaliação da influência de fatores bióticos e abióticos na produção de tricotecenos.

Usando o programa Application System (AS) da IBM, pertencente a Universidade do Rio Grande, foram feitas regressões das variáveis dependentes, tricotecenos contaminantes das sementes de trigo, pertencentes a duas variedades diferentes cultivadas em dez regiões do Estado de São Paulo, com as porcentagens de fungos produtores de tricotecenos, de fungos do gênero Fusarium, de fungos de gênero Fusarium moniliforme e variáveis abióticas como temperatura, umidade relativa e mm de chuva médios mensais dos meses pertinentes (abril a outubro de 1990), assim como altitude e latitude.

A Tabela 20 mostra a matriz inicial utilizada na determinação das relações entre toxinas e variáveis independentes. Como algumas regiões não dispunham de dados de umidade relativa as regressões foram feitas sob duas formas: 1) as que não dispunham de todos os parâmetros (20 amostras); 2) selecionando apenas as que dispunham de todos os parâmetros (10 amostras).

Tabela 20 - Matriz utilizada para análise de regressão múltipla das variáveis bióticas e abióticas.

	Ep1	Ep2	CM1	CM2	Cr1	Cr2	F1	F2	I1	I2	Mo1	Mo2	MAS1	MAS2	P1	P2	SJL1	SJL2	T1	T2	
DAS	0	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DDN	0	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0.58	0	0	0	0.59	0	0	0	0.56	0	0	
HT2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NIV	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0.39	0	0	
T2	0	0	0	0	0	0.36	0	0	0.84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T2tet.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T2tri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fmon.	0	3.5	4	8	1.5	10.5	3	15.5	7.5	2.5	2	8	0	23	0.5	24	0.5	4.5	2.5	0	
Fusarium	2	2	5	10	7.5	12.5	5.5	15.5	48.5	7	6.5	12.5	0	26	4.5	32	2.5	6	5.5	2	
Fungos	0	9.5	15.5	17.5	28.5	48	8	16	83	12	6.5	21	7.5	61	5.5	57	5.5	42	7.5	3.5	
URabril	76.7	76.7	-	-	-	-	-	-	86.3	86.3	80.3	80.3	75.9	75.9	-	-	-	-	79.2	79.2	
URmaio	77.7	77.7	-	-	-	-	-	-	82	82.1	79.6	79.6	75	75	-	-	-	-	80.2	80.2	
URjun.	74.9	74.9	-	-	-	-	-	-	98	98	74.8	74.8	69.2	69.2	-	-	-	-	78.2	78.2	
URjul	76.3	76.3	-	-	-	-	-	-	89	89	77.8	77.8	68.2	68.2	-	-	-	-	80.9	80.8	
URago.	71.4	71.4	-	-	-	-	-	-	79.1	79.1	73.7	73.7	66.1	66.1	-	-	-	-	75.5	75.5	
URset.	71	71	-	-	-	-	-	-	82.3	82.3	73	73	65.4	65.4	-	-	-	-	74.9	74.9	
URout.	70.9	70.9	-	-	-	-	-	-	82.3	82.3	73	73	67.7	67.7	-	-	-	-	72.1	72.1	
To.abr.	23.1	23.1	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4	18.4	18.4	23.1	23.1	21.3	21.3	23.5	23.5	23.4	23.4	23	23	
To.mai.	18.3	18.3	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7	13.5	13.5	19.6	19.6	17	17	19.3	19.3	17.7	17.7	17.8	17.8	
To.jun.	17.2	17.2	17.4	17.4	17.4	17.4	17.4	17.4	12.7	12.7	18.1	18.1	15.9	15.9	18.4	18.4	17.4	17.4	16.6	16.6	
To.jul.	16.5	16.5	16.1	16.1	16.1	16.1	16.1	16.1	11.1	11.1	18.2	18.2	15.3	15.3	18.1	18.1	16.1	16.1	15.8	15.8	
To.ago.	17.9	17.9	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	12.9	12.9	19.9	19.9	16.8	16.8	19.9	19.9	18.2	18.2	17.3	17.3	
To.set.	18.4	18.4	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	13.1	13.1	20.4	20.4	17.3	17.3	19.9	19.9	18.3	18.3	18	18	
To.out.	22.4	22.4	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	17.4	17.4	23.8	23.8	21.3	21.3	24.3	24.3	23.3	23.3	22.8	22.8	
chu.abr.	25.5	25.5	43.2	43.2	43.2	43.2	43.2	43.2	94.3	94.3	39.3	39.3	80.7	80.7	86.9	86.9	43.2	43.2	21.4	21.4	
chu.mai.	18.8	18.8	52.3	52.3	52.3	52.3	52.3	52.3	86.1	86.1	66.4	66.4	68.8	68.8	76.6	76.6	52.3	52.3	48.8	48.8	
chu.jun.	45.3	45.3	25	25	25	25	25	25	47	47	0	0	9.4	9.4	2.4	2.4	25	25	21.8	21.8	
chu.jul.	139.1	139.1	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	170.5	170.5	13.9	13.9	101.1	101.1	30	30	97.9	97.9	134.5	134.5	
chu.ago.	26.7	26.7	62.1	62.1	62.1	62.1	62.1	62.1	107.3	107.3	104.3	104.3	66.3	66.3	75.8	75.8	62.1	62.1	44	44	
chu.set.	55	55	108.9	108.9	108.9	108.9	108.9	108.9	138.9	139.9	50.8	50.8	62.3	62.3	48.6	48.6	108.9	108.9	50.9	50.9	
chu.out.	32.6	32.6	83.2	83.2	83.2	83.2	83.2	83.2	149.8	149.8	114.9	114.9	111.6	111.6	45.1	45.1	83.2	83.2	89.2	89.2	
latitude.	22.54	22.54	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	24.15	24.15	21.27	21.27	22.42	22.42	21.13	21.13	22.4	22.4	23.07	23.07	
altitude.	674	674	563	563	563	563	563	563	1150	1150	665	665	777	777	562	562	563	563	660	660	

Os resultados foram avaliados pela probabilidade da relação da variável dependente e da variável independente ser significativa ("F point") numa regressão múltipla, ou seja na presença de outras variáveis na equação. Normalmente considera-se relação significativa quando o F é maior que 95%, mas por se tratar de variáveis com um sistema de relação muito complexo foram considerados todos os parâmetros que puderam ser utilizados na equação de regressão entre a variável dependente e a independente.

Numa primeira etapa foram determinadas as regressões simples da variável dependente com cada variável independente. Todas as que possuíam "F point" com valores suficientes foram usadas para compor uma equação da regressão do conjunto de variáveis.

Para a variável dependente diacetoxiscirpenol a Tabela 21 mostra os resultados do primeiro caso quando são consideradas todas as observações para a análise, organizadas em ordem crescente de poder de explicação na regressão do conjunto.

A regressão múltipla das variáveis para este caso, teve seus valores alterados. Assim as que em conjunto mostraram maior poder de explicação foram fungos produtores de tricotecenos, fungos do gênero Fusarium e os mm mensais médios de chuva nos meses de junho e agosto. Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois a contaminação fúngica, com conseqüente produção de toxinas, é favorecida nos casos em que períodos chuvosos que ocorrem durante a inflorescência e formação dos grãos. A altitude também foi uma das variáveis que influenciou a produção da toxina sendo responsável por 32% da variabilidade dos resultados contra apenas 24,8% para a variável Fusarium moniliforme.

Tabela 21 - Regressão da variável DAS com as variáveis abióticas e bióticas com exceção da umidade relativa.

Variáveis independentes	regressão simples "F point" (%)	regressão múltipla "F point" (%)
variedade	41,80	0,08
temperatura em outubro	4,27	4,27
chuvas em outubro	16,77	9,88
chuvas em setembro	41,14	22,19
<u>Fusarium moliniforme</u>	22,88	24,87
altitude	45,64	32,34
chuvas de agosto	24,44	37,88
chuvas de junho	34,78	37,91
<u>Fusarium sp</u>	93,68	68,56
Fungos produtores de tricotecenos	72,47	84,27

A equação proposta para a regressão é:

$$\text{DAS} = 0,22 - 0,013 \text{ Fusarium} + 0,00013 \text{ variedade} - 0,00056 \text{ altitu-} \\ \text{de} + 0,00037 \text{ chuvas de outubro} + 0,00087 \text{ chuvas de setembro} \\ + 0,00286 \text{ chuvas de agosto} + 0,00458 \text{ chuvas de junho} - \\ 0,00584 \text{ temperatura de outubro} + 0,00675 \text{ fungos produtores} \\ \text{de tricotecenos} + 0,00494 \text{ Fusarium moniliforme}$$

A análise de variância destes parâmetros mostrou um "Fpoint" global baixo 9%, assim esta equação não pode ser usada para predizer o aparecimento da toxina diacetoxiscirpenol em amostras de grãos de trigo, quando estiverem disponíveis os valores dos parâmetros considerados pela equação.

A análise de regressão múltipla para a variável dependente diacetoxiscirpenol, selecionando apenas as observações onde se dispunha do valores de umidades relativas, não mostrou relação com nenhuma variável independente considerada. Este resultado foi ocasionado pela baixa frequência da toxina nas amostras analisadas.

A variável dependente deoxinivalenol analisada estatisticamente da mesma forma que a variável anterior tem seus resultados da primeira forma de análise na Tabela 22.

Tabela 22 - Regressão da variável DON com as variáveis abióticas e bióticas com exceção da umidade relativa.

Variáveis in- dependentes	Regressão simples "F point" (%)	regressão múltipla "F point" (%)
chuvas de julho	63,69	0,99
chuvas de junho	58,94	1,00
chuvas de agosto	87,23	7,32
temperatura de julho	63,69	9,99
temperatura de maio	90,95	11,67
chuvas de outubro	58,94	39,71
variedade	80,25	50,20
<u>Fusarium moniliforme</u>	82,22	90,51
Fungos prod. de tric.	85,08	93,10
<u>Fusarium sp</u>	75,91	97,49

No conjunto as variáveis que melhor explicaram a contaminação por deoxinivalenol foram as porcentagens de Fusarium sp, de fungos produtores de tricotecenos e de Fusarium moniliforme. A variedade e os mm médios de chuva no mes de outubro foram os outros dois fatores de maior peso em relação ao aparecimento da toxina. Da regressão resulta a seguinte equação:

$$DON = 0,14503 - 0,04122 \text{ Fusarium } - 0,10814 \text{ variedade} - 0,0032 \text{ chuvas de outubro} + 0,00689 \text{ chuvas de agosto} - 0,00105 \text{ chuvas de julho} - 0,00052 \text{ chuvas de junho} - 0,59830 \text{ temperatura de julho} + 0,54293 \text{ temperatura de maio} + 0,01132 \text{ fungos produtores de tricotecenos} + 0,03533 \text{ Fusarium moniliforme}$$

A análise de variância mostrou que esta equação, com um "Fpoint" de 72,18 ou seja, em torno de 28% de erro, não deve ser usada para prever a contaminação de trigo por deoxinivalenol.

Analisando apenas as observações onde eram conhecidos os valores de umidade relativa foram obtidos os resultados da Tabela 23.

Tabela 23 - Regressão de DON com variáveis abióticas e bióticas.

Variáveis independentes	regressão simples "F point" (%)	regressão múltipla "F point" (%)
UR de julho	50,04	50,04
chuvas de abril	96,50	63,06
temperatura de maio	85,41	67,31
UR de outubro	82,28	79,60
chuvas de agosto	98,38	89,06
fungos prod. tric.	99,77	93,37
<u>Fusarium moniliforme</u>	93,32	98,08

A equação para a regressão múltipla é:

$$DON = -1,54542 - 0,04417 \text{ Fusarium } + 0,00289 \text{ chuvas de agosto} - 0,00155 \text{ chuvas de abril} - 0,03613 \text{ temperatura de maio} + 0,02283 \text{ UR de outubro} + 0,00624 \text{ UR de junho} + 0,01532 \text{ fungos produtores de tricotecenos} + 0,03318 \text{ Fusarium moniliforme}$$

O "F point" para esta equação é 97,61, portanto com um erro menor que 3%, o que permite utilizá-la para previsão de contaminação de grãos de trigo por deoxinivalenol dispondo destes dados bióticos e abióticos.

Para a variável dependente nivalenol a análise de regressão mostrou que as variáveis independentes listadas na Tabela 24 podem justificar a variabilidade quando são consideradas todas as observações, inclusive as que não dispõem de dados de umidade relativa.

Tabela 24 - Regressão da variável NIV com variáveis abióticas e bióticas com exceção da umidade relativa.

Variáveis independentes	regressão simples "F point" (%)	regressão múltipla "F point" (%)
temperatura de maio	0,11	0,11
variedade	60,76	13,41
chuvas de setembro	89,71	24,70
<u>Fusarium moniliforme</u>	29,49	26,16
chuvas de maio	58,73	39,87
altitude	43,23	43,49
chuvas de agosto	71,58	44,72
chuvas de junho	44,58	66,68
<u>Fusarium sp</u>	73,07	92,18
fungos prod. tricotecenos	96,21	93,97

Também neste caso a presença de Fusarium sp e a presença de Fusarium moniliforme foram as variáveis que melhor explicaram o aparecimento da toxina. As variáveis abióticas que mais influenciaram nos resultados de contaminação foram: as chuvas de junho, de agosto e a altitude. Resultando da regressão a seguinte equação:

$$\text{NIV} = -0,15560 - 0,01455 \text{ Fusarium} + 0,01270 \text{ variedade} - 0,00036 \text{ altitude} - 0,00076 \text{ chuvas de setembro} + 0,00262 \text{ chuvas de agosto} + 0,00275 \text{ chuvas de maio} + 0,000009 \text{ temperatura de maio} + 0,00562 \text{ fungos produtores de tricotecenos} + 0,00311 \text{ Fusarium moniliforme}$$

O ponto F para esta relação é 52,296 portanto não se deve usá-la para prever a produção de nivalenol em grãos de trigo, pois o erro ficaria em torno de 48%.

A análise de regressão múltipla usando as observações onde a umidade relativa é conhecida tem seus resultados na Tabela 25.

Tabela 25 - Regressão múltipla de NIV com as variáveis abióticas e bióticas.

Variáveis independentes	regressão simples "F point" (%)	regressão simples "F point" (%)
UR de abril	76,32	76,32
fungos	97,20	94,56
variedade	91,05	95,49
altitude	98,89	98,23
temperatura de outubro	99,38	98,86
<u>Fusarium</u> sp	99,22	98,87
<u>Fusarium moniliforme</u>	98,74	99,31
chuvas de setembro	96,28	99,34

A equação proposta para a regressão é:

$$\text{NIV} = -0,73622 - 0,00617 \text{ Fusarium} - 0,00525 \text{ variedade} - 0,00012 \text{ altitude} + 0,0042 \text{ chuvas de setembro} + 0,02562 \text{ temperatura de outubro} + 0,00027 \text{ UR de abril} + 0,00076 \text{ fungos produtores de tricotecenos} + 0,00539 \text{ Fusarium moniliforme}$$

A análise de variância da equação apresentou um "F point" de 99,52, ou seja, um erro menor que 0,5% o que permite recomendá-la para previsão de contaminação de trigo por nivalenol.

Para a variável dependente T2 os resultados das regressões simples e múltipla considerando todas as observações estão na Tabela 26.

Tabela 26 - Regressão da variável toxina T2 com variáveis abióticas e bióticas com exceção da umidade relativa.

Variáveis independentes	regressão simples "F point(%)	regressão múltipla F point(%)
chuvas de abril	47,12	4,24
chuvas de julho	23,75	5,68
temperatura de setembro	49,93	10,93
chuvas de maio	20,80	31,94
variedade	35,43	33,46
chuvas de junho	64,95	35,75
chuvas de setembro	10,93	52,29
fungos prod. tricotecenos	92,72	56,29
<u>Fusarium</u> sp	99,96	93,97
<u>Fusarium moniliforme</u>	99,98	95,02

A presença de Fusarium moniliforme e dos demais fungos do gênero Fusarium foram as variáveis que melhor explicaram o aparecimento da toxina T2. Fatores de peso para a contaminação foram a porcentagem de fungos produtores de tricotecenos e as chuvas de setembro, ou seja período em que o grão formado permanecia no campo.

A equação resultante é:

$$T2 = 0,33036 + 0,01851 \text{ Fusarium} + 0,03843 \text{ variedade} + 0,00123 \text{ chuvas de setembro} + 0,00024 \text{ chuvas de julho} - 0,00415 \text{ chuvas de junho} - 0,00369 \text{ chuvas de maio} + 0,00016 \text{ chuvas de abril} - 0,01495 \text{ temperatura de setembro} + 0,00250 \text{ fungos produtores de tricotecenos} - 0,02408 \text{ Fusarium moniliforme}$$

Esta equação com um $F = 98,45$, pode portanto ser usada para previsão de contaminação por toxina T2 em grãos de trigo, com menos de 2% de erro. Considerando somente as observações onde se dispunha de umidade relativa, foram obtidos os resultados abaixo, na Tabela 27.

Tabela 27 - Regressão da variável toxina T2 com variáveis abióticas e bióticas

Variáveis independentes	regressão simples "F point" (%)	regressão múltipla "F point" (%)
UR de agosto	62,90	96,09
fungos produtores de tricotecenos	95,94	99,12
variedade	99,25	99,25
temperatura de abril	64,22	99,42
chuvas de abril	88,93	99,58
chuvas de agosto	81,51	99,71
<u>Fusarium</u> sp	99,89	99,79
<u>Fusarium moniliforme</u>	99,99	99,79

A equação proposta para a regressão é

$$T2 = -0,94608 + 0,03068 \text{ Fusarium} + 0,02560 \text{ variedade} - 0,00191 \text{ chuvas de agosto} + 0,00347 \text{ chuvas de abril} + 0,003979 \text{ temperatura de outubro} - 0,0077 \text{ UR de agosto} - 0,00387 \text{ fungos produtores de tricotecenos} - 0,02654 \text{ Fusarium moniliforme}.$$

O valor de F resultante da análise de variância foi 100, portanto, pode ser usada com segurança para prever a contaminação por toxina T2 em grãos de trigo.

4.5 - Incidência de tricotecenos e outras micotoxinas e microbiota fúngica em trigo nacional e importado armazenado no sul do Rio Grande do Sul

4.5.1 - Aspecto do trigo

Usando os mesmos critérios descritos em 4.4.1 avaliou-se o aspecto dos grãos sob luz visível e ultra-violeta. Todas as amostras apresentaram aspecto normal, amarelos, inteiros e sem pontos pretos ou falhas.

4.5.2 - Incidência de tricotecenos

As amostras foram submetidas a triagem, confirmação e quantificação (itens 3.7 e 3.8) e os resultados aparecem na tabela 29.

Tabela 28 - Incidência de micotoxinas em 18 amostras de trigo proveniente de silos e armazens de Rio Grande, RS.

Amostra	Procedência	Safra	Contaminantes	Nível (mg/kg)*
1	Nacional	1988	-----	
2	Nacional	1989	-----	
3	Nacional	1988	-----	
4	Nacional	1989	-----	
5	Nacional	1988	-----	
6	Nacional	1988	-----	
7	Nacional	1989	-----	
8	Nacional	1989	-----	
9	Nacional	1989	-----	
10	Nacional	1990	-----	
11	Nacional	1990	DDN	0,40
12	Argentino	1990	DAS	0,30
			T2	0,36
13	Argentino	1990	-----	
14	Argentino	1990	-----	
15	Uruguaio	1990	-----	
16	Uruguaio	1990	-----	
17	Nacional	1990	-----	
18	Argentino	1990	T2	0,35
			T2 tetraol	1,68

*média de 2 determinações.

Chama atenção que em amostras procedentes da Argentina foram detectadas apenas tricotecenos do grupo A e não deoxinivalenol como é frequente nas citações de levantamentos realizados naquele país. Isto pode ser devido a variações na microbiota fúngica com a safra e local de cultivo.

Ao contrário do esperado, apenas uma amostra proveniente do Rio Grande do Sul estava contaminada. Poder-se-ia justificar, com base em comunicações pessoais de pesquisadores gauchos, que nestes anos os invernos foram atipicamente secos. Ao contrário, no estado de São Paulo, o período de campo foi atipicamente úmido (comunicação pessoal dos pesquisadores do IAC).

Com relação aos limites de tolerância em vigor em outros países, nota-se que apenas a amostra contaminada com toxina T2 seria rejeitada para consumo pela legislação da antiga União Soviética.

4.5.3 - Incidência de outras micotoxinas

As outras micotoxinas foram determinadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.

A amostra proveniente da safra de 1988, coletada na cidade de Pelotas (Moinhos Princesa do Sul) apresentou-se contaminada com 0,040 mg/Kg de ocratoxina A.

A proposta para limite de tolerância do Grupo de Micotoxinas no âmbito nacional é de 0,050 mg/Kg, portanto esta amostra estaria apta para consumo.

4.5.4 - Microbiota fúngica

As amostras de trigo nacional provenientes de safras com maior tempo de armazenamento (1988 e 1988) apresentaram os seguintes gêneros de fungos predominantes: Drechslera, Alternaria, Cladosporium, Aspergillus e Penicillium. Sendo os dois últimos característicos de armazenamento. Do gênero Fusarium foi encontrado teores de 0,5 e 1% de Fusarium moniliforme.

O trigo nacional da safra de 1990 apresentou como fungos predominantes Drechslera, Alternaria, Cladosporium e Aspergillus. Observou-se o aparecimento de Fusarium em níveis significativos, variando entre 1 e 22% de Fusarium graminearum, 0 a 75% de Fusarium dimerum e 0 a 1% de Fusarium moniliforme.

O trigo importado (safra de 1990) também apresentou como fungos predominantes os pertencentes aos quatro gêneros encontrados nas amostras nacionais. Sendo que as porcentagens de Fusarium presentes nas amostras foram: Fusarium graminearum (1 a 15%), Fusarium poae (0,5 a 2,0%), Fusarium moniliforme (0 a 0,5%), Fusarium dimerum (0 a 0,5%) e Fusarium semitectum (0 a 1%).

A diferença fundamental com relação às amostras do Estado de São Paulo está no aparecimento de Fusarium graminearum nas amostras do Rio Grande do Sul. Esta espécie de fungo aparece frequentemente envolvida em casos de contaminação por tricotecenos no mundo. No entanto, apenas uma amostra apareceu contaminada por toxina pertencente a este grupo. Poder-se-ia atribuir ao fato de que os invernos correspondentes a estas safras terem sido atipicamente secos, segundo comunicação pessoal de pesquisadores do Rio Grande do Sul.

Comparativamente, a microbiota fúngica de grãos importados apresentou uma maior variedade de espécies de Fusarium.

5 - CONCLUSÕES

Foi proposta e avaliada uma metodologia para determinação de tricotecenos (diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol, nivalenol, toxinas HT2 e T2, T2 tetraol e T2 triol) em trigo utilizando cromatografia gasosa. A avaliação realizada mostrou uma recuperação média de 88% para diacetoxiscirpenol e 92% para nivalenol, para sete níveis de contaminação. A repetibilidade em amostras fortificadas exibiu coeficientes de variação que vão de 4,6% para o T2 tetraol e 11,9% para o T2 triol. Com amostras naturalmente contaminadas encontrou-se um coeficiente de variação mínimo de 2,8% para diacetoxiscirpenol e um máximo de 12,9% para nivalenol. Os limites de detecção do método proposto variam de 0,1 a 0,5 mg/Kg.

Foi proposto um sistema para confirmação da identidade dos tricotecenos baseado em reações químicas de acetilação, hidrólise e redução que permite prescindir do uso de espectrometria de massa.

Constatou-se que o trigo no Brasil, tanto nacional como importado, pode apresentar contaminação por tricotecenos. Estando contaminadas 23% das amostras de um total de 38 analisadas. No levantamento realizado, o deoxinivalenol predominou, aparecendo em 55% das amostras contaminadas. Contaminação com mais de um tricoteceno e presença simultânea de outras micotoxinas também foram observadas.

A análise de regressão dos dados obtidos com trigo cultivado no Estado de São Paulo, dentro das limitações derivadas do número limitado de amostras, permitiu estabelecer equações para previsão de contaminação por deoxinivalenol, nivalenol e toxina T2, com erros menores que 5%, quando se dispõe de dados sobre a umidade relativa do local de cultivo dos grãos durante sua fase de desenvolvimento. As variáveis independentes que mostraram maior poder de explicação, em ordem decrescente de importância: o grau de contaminação por Fusarium sp, por outros gêneros produtores de tricotecenos e índices pluviométricos nos meses de junho e agosto.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, H.K.; MIROCHA, C.J. & GUNTHER, R. Mycotoxins produced by *Fusarium* isolates obtained from agricultural and non agricultural areas (Arctic) of Norway. Mycopathologia, 105: 143-151, 1989.
2. ABOUZIED, M.M.; AZCONA, J.I.; BRASELTON, E.E. & PETSKA, J.J. Immunochemical assessment of mycotoxin in 1989 grain foods: Evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. Applied and Environmental Microbiology, 2(3): 672-677, 1991.
3. ABRAMSON, D.; CLEAR, R.M. & NORWICK, T.W. *Fusarium* species and trichothecene mycotoxins in suspected samples of 1985 Manitoba wheat. Canadian Journal of Plant Science, 67(3): 611-619, 1987.
4. ABRAMSON, D.; SINHA, R.N. & MILLS, J.T. Mycotoxin formation in moist 2 row and 6 row barley during granary storage. Mycopathologia, 97: 179-185, 1987.
5. ABRAMSON, D.; MILLS, J.T. & SINHA, R.N. Mycotoxin production in amber durum wheat stored at 15 and 19% moisture content. Food Additives and Contaminants, 7(5): 617-627, 1990.
6. ADAK, G. K. Use of impedimetry to detect trichothecene, mycotoxins. Screen for susceptible microorganism. International Journal of Food Microbiology, 5(1): 1-14, 1987.
7. ANNONE, J.C. & FRUTOS, E. Caracterización del comportamiento del trigo frente a *Fusarium graminearum* mediante la utilización de parametros de estabilidad. Informe Técnico. Estación Experimental Agropecuária Pergamino, Pergamino, Argentina, 219: 1-14, 1988.
8. ASEVEDO, I.G. Estudo da microbiota fúngica e influência da temperatura e da umidade na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* Link, 1809 em amostras de milho provenientes de silos, SP, 1988. Tese (Mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

9. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. A.O.A.C., 1990. 15ª edição, Washington, DC, 2.
10. BANCHERO, E.P.; de MIGUEL, M.S. & GODOY, H.M. Evaluación de la presencia de Fusarium y de micotoxinas em muestras de trigo de la campana 1985/86 y su relación con la calidad comercial; Relatorio para Secretaria de Ciencia y Tecnologia, Buenos Aires, 1987.
11. BARROS, B.C.; VALARINI, P.J. & FELICIO, J.C. Levantamento das doenças fúngicas do trigo no Estado de São Paulo nos anos de 1980 e 1981. Biológico, 48(10): 257-264, 1982.
12. BARROS, B.C. & ISSA, E. Informações sobre as moléstias da cultura de trigo ocorridas em 1976 no Estado de São Paulo (Notas e Informações). Biológico, 1/2: 41-42, 1977.
13. BARROS, S.L.S.C.; BARROS, S.S.; SANTOS, M.N. & SOUZA, M.A. Leucoencefalomalácia em equinos no Rio Grande do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira, 4(3): 101-107, 1984.
14. BARROS, B.C. Trigo no Brasil: O papel das doenças na baixa produtividade. Correio Agrícola, 2: 703-710, 1985.
15. BARROS, B.C. Avaliação da Resistência Varietal e da resposta de cultivos de trigo (T. aestivum) ao controle químico. Tese (Doutorado). Piracicaba - USP, 1988. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz.
16. BATA, A.; VANYI, A. & LASZTITY, R. Simultaneous detection of some fusariotoxins by gas liquid chromatography. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 66(3): 577-581, 1983.
17. BATA, A.; VANYI, A.; LASZTITY, R. & GALACZ, J. Determination of trichothecene toxins in foods and feeds. Journal of Chromatography, 286: 358-362, 1984.
18. BATA, A.; VANYI, A. & LASZTITY, R. Rapid analytical method for the quantitative determination of trichothecene toxin in food and feed. Acta Veterinaria Hungarica, 32(1-2): 51-56, 1984.

19. BAXTER, J.A.; TERHUNE, S.J. & QURESHI, S.A. Use of chromotropic acid for improved thin layer chromatographic visualization of trichothecene mycotoxins Journal of Chromatography, 261(1): 130-133, 1983.
20. BENNETT, G.A.; PETERSON, R.E.; PLATTNER, R.D. & SHOTWELL, O.L. Isolation and purification of deoxynivalenol and a new trichothecene by high pressure liquid chromatography. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 5: 1002A-1005A, 1981.
21. BENNETT, G.A.; STUBBLEFIELD, R.D.; SHANNON, G.M. & SHOTWELL, O.L. Gas chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 66(6): 1478-1480, 1983.
22. BENNETT, G.A. & SHOTWELL, D.L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 73(2): 270-275, 1990.
23. BETINA, V. Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins. Journal of Chromatography, 447(2): 187-234, 1989.
24. BHAT, R.V.; BEEDU, S.R.; RAMAKRISHNA, Y. & MUNSHI, K.L. Outbreak of trichothecene mycotoxicoses associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir Valley, India. Lancet I, 8628: 35-37, 1989.
25. BHAVANISHANKAR, T.N. & SHANTHA, T. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in peanut, sorghum and maize from Mysore India. Journal of Science of Food and Agriculture, 40(4): 327-332, 1987.
26. BLANEY, B.J.; RAMSEY, M.D. & TYLER, L. Mycotoxins and toxigenic fungi in insect-damaged maize harvested during 1983 in Far North Queensland. Australian Journal of Scientific Research, 35: 463-471, 1986.
27. BOSCH, U.; MIROCHA, C.J.; ABBAS, H.K. & de MENNA, M. Toxicity and toxin production by *Fusarium* isolates from New Zealand. Mycopathologia, 108: 73-79, 1989.

28. BOTTALICO, A.; LERARIO, P. & VISCONTI, A. Occurrence of trichothecenes and zearalenone in preharvest Fusarium infected ears of maize from some Australian localities. Phytopathology Mediterranea, 20: 1-6, 1981.
29. BOTTALICO, A.; LOGRIECO, A. & VISCONTI, A. Fusarium species and their mycotoxins in infected corn in Italy. Mycopathologia, 67: 85-92, 1989.
30. BULLERMAN, L.B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. Journal Food Protection, 42(1): 65-86, 1979.
31. CASALE, W.L. & HART, L.P. Inhibition of protein synthesis in maize by trichothecene mycotoxins. Phytopathology, 76(10): 1144, 1986.
32. CASALE, W.L. et al. Monoclonal antibodies against the mycotoxin deoxynivalenol and enzyme immunoassay for its detection in contaminated grain. Phytopathology, 72(12): 1967, 1987.
33. CAULCUTT, R. & BODDY, R. Statistic for Analytical Chemists. London, Chapman and Hall (ed.), 1983.
34. CHANG, H. L.; de VRIES, J.W.; LARSON, P.A. & PATHEL, H.H. Rapid determination of DON (vomitoxin) by liquid chromatographic using modified Romer column clean up. Journal of the Association of Official of Analytical Chemistry, 67(1): 52-54, 1984.
35. CHELKOWISKI, J.; KWASNA, H.; LAJKOWSKI, P.; VISCONTI, A. & BOTTALICO, A. Fusarium sporotrichioides spher and trichothecenes associated with Fusarium ears rot of corn before harvest. Mycotoxin Research, 3: 111-113, 1987.
36. CHILDRESS, W.L.; KRULL, I.S. & SELAVKA, C.M. Determination of deoxynivalenol (DON, vomitoxin) in wheat by high performance liquid chromatography with photolysis and electrochemical detection (HPLC-hv-EC). Journal of Chromatography, 28: 76-82, 1989.

37. CHIBA, J.; KAWAMURA, D.; KAJII, H.; OHTANI, K.; NAGAYANA, S. & UENO, Y. A sensitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of T2 toxin with monoclonal antibodies. Food Additives and Contaminants, 5(4): 629-639, 1988.
38. CHU, F.S. Immunoassay for analyse mycotoxin [review]. Journal of Food Protection, 47(7): 562-569, 1984.
39. CHULZE, S.; BERTINETTI, C.; DALCERO, A.; ETCHEVERRY, M. & FARNOCHI, C. Incidence of aflatoxin, zearalenone, and deoxynivalenol on corn in Argentine. Mycotoxin Research, 5(1): 9-11, 1989.
40. CIEGLER, A. Trichothecenes: Occurrence and toxicoses. Journal of Food Protection, 41(5): 399-403, 1978.
41. COHEN, H. & LAPOINTE, M. Capillary Gas chromatographic determination of T2 toxin, HT-2 toxin and DAS in cereal grains. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 67(6): 1105-1107, 1984.
42. COLE, J.R. & COX, R.H. The trichothecenes. Handbook of Toxic Fungal Metabolites, p. 152-261, 1981.
43. COLLINS, G. J. & ROSEN, J. D. Gas-liquid chromatographic Mass spectrometric screening method for T2 toxin in milk. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 62(6): 1274-1280, 1979.
44. COLLINS, J.G. & ROSEN, J.D. Distribution of T2 toxin in wet milled corn products. Journal of Food Science, 46: 877-879, 1981.
45. COUTURE, L. Receivite de cultivars de cereals du printemps a la contamination des graines sue inflorescence par le Fusarium ssp. Canadian Journal of Plant Science, 62: 29-34, 1982.
46. CHRISTENSEN, C.M. & KAUFMANN, H.H. Deterioration of stored grains by fungi. Annual Review Phytopathology, 3: 69-84, 1965.
47. D'AGOSTINO, P.A.; PROVEST, L.R. & DROVE, D.R. Analysis of trichothecene mycotoxins in human blood by capillary column gas chromatography ammonia chemical ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography, 367(1): 77-86, 1986.

48. EPPLEY, R.M. Methods for detection of trichothecenes. Journal of the American Oil Chemists Society, 58(5): 906-908, 1975.
49. EPPLEY, R.M. Trichothecenes and their analysis. Journal of the American Oil Chemists Society, 56: 824-829, 1979.
50. EPPLEY, R.M. Recommendations of panel on problems and solutions in trichothecenes methodology. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 65(4): 892-893, 1982.
51. EPPLEY, R.M. DON in winter wheat thin layer chromatographic method and survey. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 67(1): 43-45, 1984.
52. EVIDENTE, A.; RANDAZZO, G.; VISCONTI, A. & BOTTALICO, A. Isolation of 15-acetoxyscirpentiol from culture of Fusarium poae on corn. Mycotoxin Research, 5(1): 30-34, 1989.
53. FAIFER, G.C.; de MIGUEL, M. & GODOY, H.M. Patterns of mycotoxins production by Fusarium graminearum isolated from Argentine wheat. Mycopathologia, 109: 165-170, 1990.
54. FARNWORTH, E.R. & NEISH, G.A. Analyses of corn seeds for fungi mycotoxins. Canadian Journal of Plant Science, 60: 727-731, 1980.
55. GILBERT, J.; SHEPERD, M.J. & STARTIN, J.R. A survey of the occurrence of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) in UK grown barley and in imported maize by combined gas chromatography mass spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 34: 86, 1983.
56. GILBERT, J.; STARTIN, J.R. & CREWS, C. Optimisation of conditions for the trimethylsilylation of trichothecene mycotoxins. Journal of Chromatography, 319(3): 376-381, 1985.
57. GOLDLATT, L.A. & WINNER, B.A. Micotoxins. Past, present and future. Journal of the American Oil Chemists Society, 54: 302A-310A, 1977.
58. GOLINSKI, P. & GRABARKIEWICZ-SZCZENA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 67(6): 1108-1110, 1984.

59. GOLINSKI, P.; VESONDER, R.F.; LATUS-ZIETKIEWICZ, D. & PERKOWISKI, J. Formation of Fusarenone X nivalenol, zearalenone, alpha-trans zearalenol, beta-trans zearalenol and Fusarium crookwellense. Applied and Environmental Microbiology, 54: 2147-2148, 1988.
60. GRANDONI, K.M.; GENTRY, P.A.; HOLUB, J. & YAGEN, B. Comparative effects of trichothecene mycotoxins on bovine platelet function: acetyl T2, a more potent inhibitor than T2 toxin. Mycotoxin Research, 6(2): 61-63, 1990.
61. GREENHALG, R.; MILLER, J.D. & VISCONTI, A. Toxicogenic potential of Fusarium compactum R8287 and R8293. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 809-812, 1991.
62. GROVE, N.D.; BURMEISTER, H.R.; TAYLOR, S.L.; WEISLEDER, D. & PLATTNER, R.D. Effects of chemical modification on the epoxitrichothecene-induced feed refusal. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32: 541-544, 1984.
63. HIROOKA, E.Y.; VIOTTI, N.M.A.; SOARES, L.M.V. & ALFIERI, A.A. Intoxicação em equinos por micotoxinas produzidas por Fusarium moniliforme no Norte do Paraná. Semina, 9(3): 128-135, 1988.
64. HOKES, S.H.; CARLEY, M.C.; JOHNSON, E.T. & BROSKI, F.H. Use of solid-phase extraction systems to improve the sensitivity of Artenia bioassays for trichothecene mycotoxins. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 70(4): 661-667, 1989.
65. HUNT, D.C.; McCONNIE, B.R. & CROSBY, N.T. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatization and high performance liquid chromatography. Analyst, 105: 89-90, 1980.
66. HUSSEIN, H.M.; FRANICH, R.A.; BAXTER, M. & ANDREW, I.G. Naturally occurring Fusarium toxins in New Zealand maize. Food Additives and Contaminants, 6(1): 49-58, 1989.
67. HSU, I.; SMALLEY, E.B.; STRONG, F.M. & RIBELIN, W.E. Identification of T2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. Applied Microbiology, 24(5): 684-690, 1972.

68. ILUS, T.; NIKU PAAVOLA, M.L. & NARI, T.M. Chromatographic analysis of Fusarium toxins in grains samples. European Journal Applied Microbiology and Biotechnology, 244-247, 1981.
69. JARVIS, B.B.; MIDIWO, J.O. & TUTHILL, D. Interactions between the antibiotic trichothecenes and the higher plant Baccharis megapotamica. Science, 214(23): 460-461, 1981.
70. JARVIS, B.B.; MIDIWO, J.A.; BEAM, M.B.; ABOUL-NASR & BARROS, B.C. Macrocytic trichothecene mycotoxins in Brazilian species of Baccharis. Phytopathology, 77(6): 980-984, 1987.
71. JELINEK, C.F., POHLAND, A.E. & WOOD, G.E. Worldwide occurrence of mycotoxins in food and feeds - An up date. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 72(2): 223-230, 1989.
72. KALINOSKI, H.T.; UDSETH, H.R.; WRIGHT, B.W. & SMITH, R.D. Supercritical fluid extraction and direct fluid injection mass spectrometry for determination of trichothecene mycotoxins in wheat samples. Analytical Chemistry, 58(12): 2421-2425, 1986.
73. KAMIMURA, H.; NISHIJIMA, M.; YASUDA, K.; SAITO, K.; NAGAYAMA, T.; USHIYAMA, H. & NAO, Y. Simultaneous detection of several Fusarium micotoxins in cereals. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 64(5): 1067-1073, 1981.
74. KATO, T.; ASABE, Y.; SUZUKI, M.; TAKITANI, S. Spectrophotometric and fluorometric determination of trichothecene mycotoxins with reagents for formaldehyde. Analytica Chimica Acta, 106: 59-65, 1979.
75. KNAPP, D.R. Handbook of Analytical Derivatization Reactions. John Wiley and Sons (ed.), New York, 1979.
76. KIENZ, C.E. & VERMEIJ, A. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns. Journal of Chromatography, 355: 229-240, 1986.
77. KIESSLING, K.H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. Pure and Applied Chemistry, 58(2): 327-338, 1986.

78. KING, R. R. et al. Oxidative transformation of DON (vomitoxin) for quantitative and confirmatory purposes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32(1): 72-75, 1984.
79. KNUPP, C.A.; SWANSON, S.P. & BUCK, W.B. In vitro metabolism of T2 toxin by rat liver microsomes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34(5): 865-868, 1986.
80. KRIHSNAMURTHY, T. & SARVER, E.W. Mass spectral investigations of trichothecene mycotoxins III synthesis characterization and application of pentafluoropropionyl and trifluoroacetyl esters of simple trichothecenes. Journal of Chromatography, 355(1): 253-264, 1986.
81. KRIHSNAMURTHY, T.; SARVER, E.W.; GREENE, S.L. & JARVIS, B.B. Mass spectral investigation on trichothecene mycotoxins: II Detection and quantitation of macrocyclic trichothecene by gas chromatographic negative ionization mass spectrometry. (U. S. Army Chem. Res). Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 70(1): 132-140, 1987.
82. KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M. & WATANABE, H. Risk Assessment of the mycotoxin zearalenone. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2: 253-306, 1987.
83. KURATA, H. Current Scope of Mycotoxin Research from the Viewpoint of Food Mycology. Uraguchi, K. & Yamazaki, M. (Ed.). Toxicology Biochemistry and Pathology of Mycotoxins, Tokyo, 1978.
84. LACEY, J. The microbiology of cereal grains from areas of Iran with a high oesophageal cancer. Journal of Stored Products Research, 24(1): 39-50, 1988.
85. LASCA, C.C., BARROS, B.C. & VALARINI, P.J. Levantamento de fungos de sementes de trigo produzidas no estado de São Paulo e comparação de incidencia de manchas foliares com infecção de sementes por Helminthosporium sativum P.K. & B. Summa Phytopatologica, 2: 95-96, 1983.

86. LAUREN, D.R. & GREENHALG, R. Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereal by liquid chromatography. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 70(3): 479-483, 1987.
87. LAUREN, D.R. & AGNEW, M.P. Multitoxin screening method for Fusarium mycotoxins in grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 502-507, 1991.
87. LEE, U.S.; JANGH, S.; TANAKA, T.; HASSEGAWA, A.; OH, Y.J. & UENO, Y. The coexistence of the Fusarium micotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearaleona in Korean cereal harvested in 1983. Food Additives and Contaminants, 2(3): 185-192, 1985.
89. LEE, U.S.; JANG, H.-S.; TANAKA, A.; OH, Y.-J.; CHO, C.-M.; SUGIURA, Y. & UENO, Y. Further survey on the Fusarium mycotoxins in Korean cereals. Food Additives and Contaminants, 3(3): 253-262, 1986.
90. LILLEHOJ, E.B. & ZUBER, M.S. Distribution of toxin producing fungi in maize kernels from diverse environments. Tropical Science, 28: 19-24, 1988.
91. LINHARES, I.W., SARTORI, J.F. & MOREIRA, C.S. Influência do ambiente no desenvolvimento de Giberela do trigo. Fitopatologia Brasileira, 11(4): 979-989, 1986.
92. LUO, Y.; YOSHIZAWA, T. & KATAYAMA, T. Comparative study on the natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high and low-risk areas from human esophageal cancer in China. Applied and Environmental Microbiology, 56(12): 3723-3726, 1990.
93. MARASAS, W.F.D.; KRIEK, N.P.J.; van RENSBURG, S.J.; STEYN, N. & van SCHALKWYK, G.C. Occurrence of Zearalenone and deoxynivalenol mycotoxins produced by Fusarium graminearum schuval, in maize in Southern Africa. South Africa Journal of Science, 73: 346-349, 1977.

94. MAROCHI, M.A. Uma metodologia para triagem, quantificação e confirmação de tricotecenos e zearalenona utilizando cromatografia de camada delgada. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1988.
95. MARPEGAN, M.R. Feed refusal of pigs caused by *Fusarium* mycotoxins in Argentina. Journal Vet. Med. Ser. A, 35(8): 610-616, 1988.
96. MARTIN, P.J.; STAHR, P.J.; HYDEN, W. & DOMOTO, M. Chromatography of trichothecenes mycotoxins. Journal of Liquid Chromatography 2(7): 1591-1602, 1986.
97. McCORNICK, S.P.; SCOTT, T.L.; PLATTNER, R.D. & BEREMAND, M.N. Bioconversion of possible T2 toxin precursors by a mutant strain of *Fusarium sporotrichioides* NRRL-3299. Applied and Environmental Microbiology, 56(3): 702-706, 1990.
98. McLEAN, M. & BERJAK, P. Maize grains and thin associated mycoflora - a microbiological consideration. Seed Science and Technology, 15: 831-850, 1987.
99. MEIRELLES, M.C.A.; CORREA, B.; PURCHIO, A.; FISCHMAN, A.; GAMBALI, W. & PAULA, C.R. Microbiota fúngica em alimentos envolvidos com quadro de leucoencefalomalácia equina (LEME), ocorridas no ano de 1988. Revista de Microbiologia. Resumo XV, 20. (Congresso Brasileiro de Microbiologia), 1989.
100. MEIRELLES, M.C.A.; CORREA, B.; PURCHIO, A.; FISCHMAN, A.; GAMBALI, W. & PAULA, C.R. Leucoencefalomalácia equina (LEME), no Brasil; aspectos microbiológicos, micotoxicológicos e epidemiológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 e 1989; VI Encontro Nacional de Micotoxinas, Anais do Instituto Adolfo Lutz, 1990.
101. MENDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; FERREIRA, L.M.; MEIRELLES, M.C.A. Doenças diagnosticadas no ano de 1989. Relatório do Laboratório Regional de Diagnósticos. Pelotas, Univ. Fed. Pelotas, Fac. de Veterinária, 1989.
102. MEHTA, Y.R. Doenças do trigo e seu controle. Ed. Agronômica Ceres, Londrina, Paraná, 1978.

103. MILLER, J.D. & YOUNG, J.C. Fusarium toxin in field corn. I. Time course of fungal growth and production of Deoxynivalenol and other mycotoxins. Canadian Journal of Botany, 61(12): 3080-3087, 1983.
104. MILLER, J.D. & GREENHALGH, R. Nutrient effects on biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by Fusarium graminearum. Mycologia, 77(1): 130-136, 1985.
105. MILLER, J.D. & GREENHALGH, R. Trichothecenes chemotypes of three Fusarium species. Mycologia, 33(2): 121-130, 1991.
106. MILLS, E.N.C.; JOHNSTON, J.M.; KEMP, H.A. & MORGAN, M.R.A. An enzyme linked immunosorbent assays for diacetoxyscirpenol applied to the analysis of wheat. Journal of Science of Food and Agriculture, 42(3): 225-233, 1988.
107. MILLS, J.T. & WALLACE, A.H. Microflora and condition of cereal seeds after a wet harvested. Canadian Journal of Plant Science, 59: 645-651, 1979.
108. MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic Fusarium species on cereal seeds. Journal Food Protec, 52(10): 737-742, 1989.
109. MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; SCHAWERHANER, B. & CHRISTENSEN, C.M. Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff. Applied and Environmental Microbiology, 553-556, 1976.
110. MIROCHA, C.J., ABBAS, H.K., KOMMEDAHL, T. & JARVIS, B.B. Mycotoxin production by Fusarium oxysporum and Fusarium sporotriciodes from Baccharis spp from Brazil. Applied and Environmental Microbiology, 55(1): 254-255, 1984.
111. MIROCHA, C.J. & ABBAS, H. K. Variation in deoxynivalenol, 3 acetyldeoxynivalenol and zearalenone production by Fusarium graminearum isolates. Applied and Environmental Microbiology, 55(5): 1315-1316, 1989.
112. MONNET, D.; VIDAL, D. & CREACH, O. Influence of metabolic and physical factors on production of diacetoxyscirpenol by Fusarium sambicium Fuckel. Applied and Environmental Microbiology, 54(9): 2167-2169, 1988.

113. MOTA, F.S. Clima e zoneamento para triticultura no Brasil. In: Trigo no Brasil. Campinas, Fundação Cargill, 1982.
114. MUNOZ, L.; CARDELLI, M.; PEREIRO, M. & RIGUERA, R. Occurrence of corn mycotoxins in Galicia (Northwest Spain). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 1004-1006, 1990.
115. NAIK, D.M.; BUSH, L.V.; BARRON, G.L. Influence of temperature on the strain of Fusarium graminearum schwabe in zearalenone production. Canadian Journal of Plant Science, 50: 1095-1097, 1978.
116. NEISHEM, G.A. & TRUCKSSES, N. Thin layer cromatography/high performance thin layer cromatography as tool for mycotoxin determination. In: Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins. Richard J. Cole (Ed.), Orlando, 1986, Academic Press.
117. NEISH, G.A. and COHEN, H. Vomitoxin and zearalenone production by Fusarium graminearum from winter wheat and barley in Ontario. Canadian Journal of Plant Science, 61: 811-815, 1981.
118. NOWICKI, T.W.; GABA, D.G.; DEXTER, J.E.; MATSWO, R.R. & CLEAR, R.M. Retention of Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking spaguetti moddles. Journal of Cereal Science, 8(2): 189-202, 1988.
119. OLSEN, M.; PETERSON, H.; SANDHOLM, K.; HOLMBERGT, T.; RUTOVIST, L. & KIESSLING, K.H. The occurrence of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol in maize imported into Sweden. Swedish Journal of Agricultural Research, 16: 77-80, 1986.
120. OSBORNE, B.G. Mycotoxins and the cereal industry a review. Journal of Food Technology, 17: 1-9, 1982.
121. OSBORNE, B.G. & WILLIS, K.H. Studies into the occurrence of some trichothecene mycotoxins in U.K. home grown wheat and in imported wheat. Journal of the Science of Food and Agriculture, 35: 579-583, 1984.
122. PACKA, D. Cytogenetic changes in plant cells as influenced by mycotoxins. Mycotoxins Research, Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity, 7A (part 2): 102-115, 1991.

123. PALMISANO, F.; VISCONTI, F.; BOTTALICO, A.; LERARIO, P. & ZAMBONIN, P.G. Differential pulse polarography of trichothecene toxins: detection of deoxynivalenol in corn. Analyst, 106(1266): 992-998, 1981.
124. PAWLOSKI, R.J.; MIROCHA, C.J.; WEN, Y. & ABBAS, H.K. Use a deuterated internal standards quantitation of T2 and HT2 toxins in human blood by tandem mass spectrometry. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 72(5): 811-812, 1989.
125. PERKOWSKI, J.; PLATTNER, R.D.; GOLINSKI, P.; VESONDER, R.F. & CHELKOWSKI, J. Natural occurrence of deoxynivalenol, 3 acetyl deoxynivalenol, 15 acetyldeoxynivalenol, and zearalenone in polish wheat. Mycotoxins Research, 6(1): 91-93, 1990.
126. PERKOWSKI, J.; CHELKOWSKI, J.; BLAZCZAK, P.; SNIJDERS, C.H.A. & WAKULINKI, W. A study of the correlations between the amount of deoxynivalenol in grain of wheat and triticale and percentage of Fusarium damaged kernels. Mycotoxins Research, 2nd European Seminar Fusarium, 7a (PART 2): 102-115, 1991.
127. PORCHER, J.M.; LAFARGE-FRAYSSINET, C.; FRAYSSINET, C.; MURIE, A.; MELCION, D. & RICHARD-MOLARD, D. Determination of citotoxic trichothecenes in corn by cell culture toxicity assay. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 70(5): 844-849, 1987.
128. POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. & CHACON-RECHE, N.D. Milho pós-colheita e armazenado: Interação da microbiota fúngica x fatores abióticos e ocorrência de micotoxinas. VII Encontro Nacional de Micotoxinas, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1992.
129. PRZYBYLSKY, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 58(1): 163-165, 1975.
130. RAJAKYLA, E.; LAASASENAHO, K. & SAKKERS, P.J.D. Determination of mycotoxins in grain by high-performance liquid chromatography and thermospray liquid chromatography mass spectrometry. Journal of Chromatography, 384: 391-402, 1987.

131. RAMAKRISHNA, Y.; BHAT, R.V. & RAVINDRANATH, V. Production of deoxynivalenol by *Fusarium* isolates from samples of wheat associated with a human mycotoxicoses outbreak. Applied and Environmental Microbiology, 55(10): 2619-2620, 1989.
132. RAMAKRISHNA, Y.; BHAT, R.V.; VASSANTHI, S. Natural occurrence of mycotoxins in staple foods in India. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 1857-1859, 1990.
133. REIS MELO, E. Caracterização da população de *Fusarium graminearum* ocorrente no sul do Brasil. Fitopatologia Brasileira, 11(3): 527-533, 1986a.
134. REIS MELO, E. Metodologia para determinação de perdas causadas em trigo por *Gilberella zeae*. Fitopatologia Brasileira, 11(12): 951-955, 1986b.
135. RIET-CORREA, F.; MEIRELLES, M.A.; SOARES, J.M.; MACHADO, A.E.; ZANBRAND, A.F. Leucoencefalomalácia em equinos associada a ingestão de milho mofado. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2(1): 27-30, 1982.
136. RIZZO, A.; SAARI, L. & LINDFORS, E. Derivatization of trichothecenes and water of their trimethylsilyl ethers in anhydrous apolar solvent. Journal of Chromatography, 368(2): 381-386, 1986.
137. RICHARDSON, K.E.; HAGLER, W.M.; HANEY, C.A. & HAMILTON, P.B. Zearalenone and trichothecene production in soybeans by toxigenic *Fusarium*. Journal of Food Protection, 48(3): 240-243, 1985.
138. ROMER, T. Chromatographic Techniques for Mycotoxins. In: Lawrence, J.E. (ed.). Food Constituents and Food Residues. Marcel Dekker, New York, 1984.
139. ROMER, T.R. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feed. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 69(4): 699-703, 1986.

140. ROMER, T.R.; BOLING, T.M. & McDONALD, J.L. Gas liquid chromatographic determination of T2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 61(4): 801-808, 1978.
141. ROOD, H.D.; BUCK, W.B. & SWANSON, S.P. Diagnostic screening method for the determination of trichothecene exposure in animals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36: 74-79, 1988.
142. ROOD, H.D.; BUCK, W.B. & SWANSON, S.P. Gas chromatographic screening method for T2 toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol and related trichothecenes in feeds. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 71(3): 493-498, 1988.
143. ROSEN, R.J. & ROSEN, J.D. Presence of four Fusarium mycotoxins and synthetic materia in "yellow rain". Biomedical Mass Spectrometry, 9(10): 443-450, 1982.
144. SABINO, M.; ICHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I. & LAMARDO, L.C.A. Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 49(2): 155-159, 1989.
145. SANDO, A.; ASABE, Y.; TAKITANI, S. & UENO, Y. Fluorodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with nicotinamide and 2 acetylpyridine on silica gel layer. Journal of Chromatography, 235(1): 257-265, 1982.
146. SAVARD, M.E. Deoxynivalenol fatty acid and glucoside conjugates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(3): 570-574, 1991.
147. SCHAPIRA, S.F.D.; WHITEHEAD, M.D. & FLANNIGAN, B. Effects of the mycotoxins diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol on malting characteristics of barley. Journal of the Institute of Brewing, 95: 415-417, 1989.

148. SCHEIGHARDT, H.; BOHM, J.; ABDELHAMID, A.M.; LEIBETESEDER, J.; SCHUH, M. & GLAWISCHNING, E. Analysis of fusariotoxins in zearalenone and vomitoxin (deoxynivalenol) in human food and animal feed by high performance liquid chromatography (HPLC). Chromatographia, 13(7): 447-450, 1980.
149. SCHIMIDT, R.; ZIEGENHAGEN, E. & ROSE, K. High performance liquid chromatography of trichothecenes. I detection of T2 toxin and HT2 toxin. Journal Of Chromatography, 212(3): 370-373, 1981.
150. SCHIMIDT, R.; ZIEGENHAGEN, E. & ROSE, K. Quantitative determination of trichothecenes HT2 toxin in moldy cereal grain and vegetable foods. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 175: 169-171, 1982.
151. SCHNEIDER, E.; DIETRICH, R.; MARTEBAUER, E.; USLEBER, E. & TERPLAN, G. Detection of aflatoxins, trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone by test strip enzyme immunoassay: A rapid method for screening cereals for mycotoxins. Food and Agricultural Immunology, 3: 185-193, 1991.
152. SCHRÖEDER, H.W. & CHRISTENSEN, . Factors affecting resistance of wheat scabe caused by Gibberella zeae. Phytopathology, 53: 831-838, 1963.
153. SCOTT, P.M. Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grains products. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 65(4): 876-883, 1982.
154. SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; DEXTER, J.E.; BRENNAN, P.W. & TRENHOLM, H.L. Distribution of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. Food Additives and Contaminants, 1(4): 313-323, 1984.
155. SCOTT, P.M.; NELSON, K.; KANHERE, S.R.; KARPINSKI, K.F.; HAYWARD, S.; NEISH, G.A. & TEICH, A.H. Decline in deoxynivalenol (vomitoxin) concentration in 1983 Ontario winter wheat before harvested. Applied and Environmental Microbiology, 48(4): 884-886, 1984.

156. SCOTT, P.M. Effects of food processing on mycotoxins. Journal of Food Protection, 47(6): 489-499, 1984.
157. SCOTT, P.M. & KANHERE, S.R. Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. Journal of Chromatography, 368(2): 374-380, 1986.
158. SCOTT, P.M. Mycotoxins. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 71(1): 70-76, 1988.
159. SCOTT, P.M.; LOMBAERT, G.A.; PELLAERS, P.; BACLER, S.; KANHERE, S.R.; SUN, W.F.; LAW, P.Y. & WEBER, D. Application of capillary gas chromatography to a survey wheat for five trichothecenes. Food Additives and Contaminants, 66(4): 489-500, 1989.
160. SCOTT, P.M. The natural occurrence of trichothecenes. In: Trichothecenes Mycotoxicoses Pathophysiologic Effects. Val Richard Brasley (Ed.), CRC, 1989, v. 1.
161. SCOTT, P.M. Mycotoxins General Referee Reports. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 73(1): 98-105, 1990.
162. SCOTT, P.M. Mycotoxins General Referee Reports. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 74(1): 120-128, 1991.
163. SCOTT, P.M. Mycotoxins General Referee Reports. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 75(1): 95-102, 1992.
164. SHEPHERD, M. & GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solutions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36: 305-308, 1988.
165. SHOTWELL, D.; 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. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 68(5): 954-957, 1985.

166. SHOTWELL, O.L. Chemical Survey Methods for Mycotoxins. In: Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins. Richard J. Cole (ed.), Orlando, 1986, Academic Press.
167. SIGG, H.P.; MAULI, R.; FLURY, E. & HAUSER, D. Die konstitution von diacetoxyscirpenol. Helvetica Chimica Acta, 4(104): 962-987, 1965.
168. SINHA, R.N. Use of multivariate methods in the study of stored-grain ecosystems. Environmental Entomology, 6(2): 185-192, 1977.
169. SINHA, R.N., ABRAMSON, D. & MILLS, J.T. Interrelation among ecological variables in stored cereals and association with mycotoxins production in the climatic zones of western Canada. Journal of Food Protection, 49(8): 608-614, 1986.
170. SNYDER, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins. Journal of Food Protection, 49(7): 544-569, 1986.
171. SOARES, L.M.V. Micotoxinas: Um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas. (Tese de Doutorado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Univeridade Estadual de Campinas, 1987.
172. STAHR, H.M.; LERDAL, D.; HYDE, W. & PFEIFFER, R. Analysis of thichothecenes mycotoxins. Applied Spectroscopy, 37(4): 396-400, 1983.
173. STACK, M. & RODRICKS, J.V. Method of analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 51(1): 86-90, 1971.
174. STEYN, P.S. Multimycotoxin analysis. Pure & Applied Chemistry, 53: 891-902, 1981.
175. SUGIURA, Y.; WATANABE, Y.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, S. & UENO, Y. Occurrence of Gibberella zeae strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. Applied and Environmental Microbiology, 56(10): 3047-3051, 1990.

176. SWANSON, S.P.; DAHLEM, A.M.; ROOD, H.D.Jr. & COTE, L.M. Gas chromatographic analysis of milk for deoxynivalenol and its metabolite DON-1. Journal of the Association of Official Analytical Chemistry, 69(1): 41-43, 1986.
177. SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.D. & NIEUWENHUIS, J.J. Occurrence of DON and NIV in *Fusarium graminearum* infected undergrade wheat in South Africa. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(4): 921-926, 1986.
178. SYDENHAM, E.W. & THIEL. The simultaneous determination of diacetoxyscirpenol and T2 toxin in fungal cultures and grains samples by capillary gas chromatography. Food Additives and Contaminants, 4(3): 277-284, 1987.
179. SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.D.; SHEPHARD, G.S.; van SCHALKWYK, D.J. & KOCH, K.R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, South Africa. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36: 1900-1903, 1990.
180. SYLVIA, V.L.; PHILLIPS, T.D.; CLEMENT, B.A.; GREEN, J.L.; KUBENA, L.F. & HEIDELBAUGH, V.D. Determination of DON (vomitoxin) by HPLC with electrochemical detection. Journal of Chromatography, 362(1): 79-85, 1986.
181. SZATHMARY, C.I.; MIROCHA, C.J.; PALYUSIK, M. & PATHRE, S.V. Identification of mycotoxins produced by species of *Fusarium* and *Stachybotrys* obtained from Eastern Europe. Applied and Environmental Microbiology, 32(4): 579-584, 1976.
182. SZATHMARY, C.I.; GALACZ, J.; VIDA, L. & ALEXANDER, G. Capillary gas chromatographic mass spectrometric determination of some mycotoxin causing fusariotoxicoses in animals. Journal of Chromatography, 191: 327-331, 1980.
183. TAKEDA, Y.; ISCHATA, E.; AMANO, R. & UCHIYAMA, M. Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 62(3): 1979.

184. TAKITANI, S.; ASABE, Y.; KATO, T.; SUZUKI, M. & UENO, Y.
Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4-(p-nitrobenzyl) pyridine on silica gel thin layer chromatograms. Journal of Chromatography, 172: 335-342, 1979.
185. TAKITANI, S. & ASABE, Y. Thin layer chromatographic analysis of trichothecene mycotoxins. In: UENO, Y. (ed.). Development in Food & Science: Trichothecene: Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Elsevier, Tokyo, 1983, v. 4.
186. TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; ISHII, K. & UENO, Y.
Improved methodology for simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. Food Additives and Contaminants, 2(2): 125-137, 1985.
187. TANAKA, T.; HASEGAWA, Y.; MATSUKI, Y.; LEE, U.S. & UENO, Y. A limited survey of Fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in 1984 U.K. harvested wheat and barley. Food Additives and Contaminants, 3(3): 247-252, 1986.
188. TANAKA, T.; YAMAMOTO, S.; HASEGAWA, A.; AOKI, N. & BESLING, J.R.
Worldwide contamination of cereals by Fusarium mycotoxins nivalenol, dexynivalenol and zearalenone. I survey of 19 countries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36(5): 979-983, 1988.
189. TANAKA, T.; YAMAMOTO, S.; HASEGAWA, A.; AOKI, N. & BESLING, J.R.
A survey of the natural occurrence of Fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, in cereal harvested in the Netherlands. Mycopathologia, 110: 19-22, 1990.
190. TAPIA, M.D. A quantitative thin layer chromatography method for analysis of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, T2 toxin and sterigmatocystin in foodstuffs. Revista Argentina de Microbiologia, 17(4): 185-186, 1985.
191. TEICH, A.H. & HAMILTON, J. R. Effects of cultural practices soil phosphorous, potassium and pH on incidence of Fusarium head blight and deoxynivalenol levels in wheat. Applied and Environmental Microbiology, 59(6): 1429-1431, 1985.

192. TEICH, A.H. Ena wheat. Canadian Journal of Plant Science, 69(2): 541-543, 1989.
193. THIEL, P. G.; MEYER, C.J. & MARASAS, W.F.D. Natural occurrence of moniliformin together with in deoxynivalenol and zearalenone in Transkeian corn. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30: 308-312, 1982.
194. THRANE, U. Detection of toxigenic Fusarium isolates by thin layer chromatography. Letters in Applied Microbiology, 3: 96-97, 1986.
195. THRANE, U. Screening for Fusarium C production by European isolates of Fusarium species. Mycotoxin Research, 4(1): 2-10, 1988.
196. TIEBACH, R.; BLAAS, W.; KELLERT, M.; STEINMEYER, S. & WEBER, R. Confirmation of NIV and DON by on line liquid Chromatography mass spectrometry: comparison of methods. Journal of Chromatography, 318(1): 103-111, 1985.
197. Toxigenic Fungi. Their Toxins and Health Hazard. In: KURATA, H. & UENO, Y. (eds.). Development in Food Science. Proceedings of Mycotoxins Symposia. Tokyo, 1983 (3rd Int. Mycological Congress).
198. TORRES, A.; CHULZE, S.; DALCERO, A.; ETCHEVERRY, M. & FARNOCHI, C. Deoxynivalenol and nivalenol in wheat and by products in Argentina. Mycotoxin Research, 6(2): 89-92, 1991.
199. TRENHOLM, H.L.; WARNER, R.M. & PRELUSKY, D.B. Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grains products for DON (vomitoxin). Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 68(4): 645-649, 1985.
200. TRUCKSESS, M.N.; NESHEIM, S. & EPPLEY, R.M. Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 67(1): 40-43, 1984.

201. TRUCKSESS, M.N.; FLOOD, M.T.; MOSSOBA, H.M. & PAGE, S.W. High performance thin layer chromatographic determination of DON, fusarenol X and nivalenol in barley, corn and wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35(4): 445-448, 1987.
202. TSENG, T-C.; YUAN, G.F.; TSENG, J.; HSIAO, I-W. & MIROCHA, C.J. Natural occurrence of Fusarium mycotoxins in grains and feeds in Taiwan. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 26: 83-95, 1985.
203. TUTELYAN, V.A.; ELLER, K.I.; SOBOLEV, V.S.; PIMENOVA, V.V.; ZAKHRDVA, L.P. & MUZYCHENKO, N.I. A survey of the occurrence of deoxynivalenol in wheat from 1986-1988 harvested in the USSR. Food Additives and Contaminants, 7(4): 521-525, 1990.
204. UENO, Y. Mode of action of trichothecene. Pure & Applied Chemistry, 49: 1737-1745, 1977.
205. UENO, Y. Trichothecene: Chemical, Biological and Toxicological Aspects. In: UENO, Y. (ed.). Developments in Food Science. Elsevier, Tokyo, 1983, v. 4.
206. UENO, Y. Trichothecene as environmental toxicants. In: HODGSON, E. (Ed.). Reviews in Environmental Toxicology. Elsevier, Amsterdam, 1986, cap. 2.
207. VALARINI, P. J., BARROS, B. C. & LASCA, C. C. Organismos associados a podridão comum de raízes de trigo. Summa Phytopathologica, 7: 71-79, 1981.
208. VAN EGMOND, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. Food Additives and Contaminants, 6(2): 139-188, 1989.
209. VISCONTI, A. & BOTTALICO, A. Detection of Fusarium trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, fusarenol and 3 acetoxynivalenol) by high performance liquid chromatography. Chromatographia, 17(2): 97-100, 1983.
210. VISCONTI, A.; BOTTALICO, A.; PALMISANO, F. & ZAMBONIN, P.G. Differential-pulse polarography of trichothecene mycotoxins. Analytica Chimica Acta, 159: 111-118, 1984.

211. VISCONTI, A.; CHELKOWSKI, J. & BOTTALICO, A. Deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol-micotoxins associated with wheat head fusariosis in Poland. Mycotoxin Research, 2: 59-64, 1986.
212. VISCONTI, A.; CHELKOWSKI, J.; SOLFRIZZO, M. & BOTTALICO, A. Mycotoxins in corn ears naturally infected with Fusarium graminearum and Fusarium crookwellense. Canadian Journal of Plant Pathology, 12: 187, 1990.
213. VOYKSNER, R.D.; HAGLER, W.M.; TYCZKOWSKA, Jr. & HANEY, D.A. Thermospray high performance liquid chromatographic mass spectrometric analysis of some Fusarium micotoxins. Journal of High Resolution Chromatography, 8(3): 119-125, 1985.
214. XIA, Q. Trichothecenes in staple food from high incidence area of Carcinoma oesophageal and gastric cardia and their carcinogenicity. Abstract of Mycology, 87053426, 1989.
215. XU, Y.C.; ZHANG, G.S. & CHU, F.S. Radioimmunoassay of DON in wheat and corn. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 69(6): 967-969, 1986.
216. WARE, G.M.; FRANCIS, D.J.; CARMAN, A.S. & KUAN, S.S. Gas chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat with electron capture detection: Collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 69(5): 899-901, 1986.
217. WERNIMONT, G.T. Use of statistic to developed and evaluate analytical methods. Association of the Official Analytical Chemists, USA, 1985.
218. WHITEHEAD, M.P. & FLANNING, B. The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol and yeast growth and fermentation. Journal of Institute of Brewing, 92: 411-413, 1989.
219. WOOD, G.D. & CARTER, L.Jr. Limited survey of deoxynivalenol in wheat and corn in United States. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 72(1): 38-40, 1989.
220. WREFORD, B. & SHAW, K.J. Analysis of deoxynivalenol as its trifluoroacetyl ester by gas chromatography electron ionization mass spectrometry. Food Additives and Contaminants, 5(2): 141-147, 1987.

221. YANGEN, B., SINTOV, A. & BIALE, M. New sensitive thin layer chromatographic high performance liquid chromatographic method for detection of trichothecene mycotoxins. Journal of Chromatography, 356(1): 195-201, 1986.
222. YONEYAMA, M. & SHARMA, R.P. Functional alterations induced by Fusarium T2 toxin in Maden Daiby bovine kidney (MDBK) and primary fetal bovine kidney (PFBK) cultures. Mycotoxin Research, 5(1): 21-29, 1989.
223. YOSHIZAWA, T., ONOMOTO, C. & MOROOKA, N. Microbial acetyl of T2 toxin and its derivatives. Applied and Environmental Microbiology, 39: 962-966, 1980.
224. YOSHIZAWA, T. & HOSOKAWA, H. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and nivalenol, trichothecene mycotoxins in commercial foods. Journal Food Hygienic Society of Japan, 24(4): 413-415, 1983.